

Université de Sherbrooke

**Méthode de dosage de PACE4 pour l'évaluation de son potentiel comme biomarqueur
du cancer de la prostate**

Par
Frédéric Dufour
Programme de biochimie

Mémoire présenté à la Faculté de médecine et des sciences de la santé
en vue de l'obtention du grade de maître ès sciences (M. Sc.)
en biochimie

Sherbrooke, Québec, Canada
Août 2016

Membres du jury d'évaluation
Pr Robert Day, Programme de biochimie
Dr Robert Sabbagh, Programme de médecine
Pr Xavier Roucou, Programme de biochimie
Pr Klaus Klarskov, Programme de pharmacologie

© Frédéric Dufour, 2016

À grand-papa

RÉSUMÉ

Méthode de dosage de PACE4 pour l'évaluation de son potentiel comme biomarqueur du cancer de la prostate

Par
Frédéric Dufour
Programmes de biochimie

Mémoire présenté à la Faculté de médecine et des sciences de la santé en vue de l'obtention du diplôme de maître ès sciences (M. Sc.) en biochimie, Faculté de médecine et des sciences de la santé, Université de Sherbrooke, Sherbrooke, Québec, Canada, J1H 5N4

L'utilité clinique du dosage de l'antigène prostatique spécifique (APS) est maintenant remise en question pour le dépistage du cancer de la prostate (CaP) puisque ce biomarqueur est non spécifique au CaP. Ce test de dépistage demeure tout de même fréquemment utilisé en clinique par manque de meilleurs biomarqueurs. De plus, le manque d'outil pronostique pour ce type de cancer est un problème clinique auquel il est impératif de s'attaquer. Les travaux faits par notre groupe de recherche fournissent plusieurs évidences appuyant l'hypothèse que l'isoforme consensuelle de PACE4 (PACE4-CtCons) ainsi qu'une isoforme récemment découverte dont l'extrémité C-terminale est distincte (PACE4-CtAlt) pourraient représenter des biomarqueurs utiles du CaP. Cependant, aucun essai biochimique n'est disponible pour doser précisément les niveaux de ces deux isoformes dans les prélèvements sanguins ou dans l'urine. Un essai d'immunoprécipitation couplée à une analyse de spectrométrie de masse en tandem (MS/MS) adaptée du mode *multiple reaction monitoring* (pseudoMRM) a ainsi été développé. Tout d'abord, 6 transitions (2 par peptides) ont été sélectionnées et optimisées pour quantifier les peptides MLELSAPELEPPK et NVVVTILDDGIER, communs aux deux isoformes, ainsi que le peptide LETFWVVTGR, unique à PACE4-CtAlt avec des limites de détection à des concentrations inférieures à 5 nM. Pour l'essai, trois anticorps ont été produits (anti-domaine P, anti-CtCons et anti-CtAlt) et la spécificité a été validée. L'essai a été employé dans l'urine et dans les plasmas de patients atteints d'un CaP. PACE4-CtAlt n'a été observée dans aucun des échantillons cliniques analysés durant cette étude. Pour ce qui est de PACE4-CtCons, il n'a été détecté que dans les prélèvements sanguins. Les niveaux de PACE4-CtCons ont ensuite été déterminés dans 33 prélèvements sanguins avec l'anti-domaine P pour comparer des patients atteints d'un CaP (N = 25) et des échantillons contrôles (N = 8). Il y aurait 2,2x plus de PACE4-CtCons dans le sang des patients atteints d'un CaP que chez les patients contrôles. En somme, il est possible de conclure que les niveaux sanguins de PACE4-CtCons sont plus élevés chez des patients atteints d'un CaP que chez les patients sains, mais qu'il n'y aurait pas de PACE4 dans l'urine. Aussi, un essai plus sensible comme l'ELISA est nécessaire pour doser les niveaux de PACE-CtAlt dans ces prélèvements si cette isoforme peut effectivement atteindre le sang.

Mots clés : Protéines convertases, PACE4, cancer de la prostate, biomarqueur, spectrométrie de masse, *multiple reaction monitoring*

TABLE DES MATIERES

Résumé	iii
Table des matières	iv
Liste des figures	vii
Liste des tableaux	viii
Liste des abréviations	ix
Introduction	11
1.1 Les biomarqueurs.....	11
1.1.1 Définition et caractéristiques	11
1.1.2 Étapes de la validation d'un biomarqueur	12
1.1.3 Méthodes de d'étude des biomarqueurs	12
1.1.3.1 Méthode sélective en spectrométrie de masse pour l'étude des biomarqueurs	13
1.1.4 Exemples de biomarqueurs en oncologie	14
1.2 Le cancer de la prostate.....	15
1.2.1 Épidémiologie	15
1.2.2 Prédisposition génétique	15
1.2.3 Dépistage et diagnostic	16
1.2.3.1 Antigène prostatique spécifique	17
1.2.3.2 Histoire de l'APS comme outil de dépistage du cancer de la prostate	18
1.2.3.3 Limites de l'APS pour le dépistage	18
1.2.4 Pronostic	19
1.2.4.1 Surveillance active	20
1.3 Les proprotéines convertases	20
1.3.1 Domaines structuraux conservés et maturation	21
1.3.1.1 Le peptide signal	22
1.3.1.2 Le prodomaine	22
1.3.1.3 Le domaine catalytique	22
1.3.1.4 Le domaine P	23
1.3.2 Localisation cellulaire et distribution tissulaire	23
1.3.3 Rôle unique de PACE4 dans le cancer de la prostate	25
1.3.3.1 Surexpression de PACE4 dans les tissus	25
1.3.3.2 PACE4 est dosable dans le sang	26
1.3.3.3 Influence de PACE4 sur la tumorigénèse et la progression du CaP	26
1.3.3.4 Nouvelle isoforme de PACE4 spécifique au cancer : PACE4-CtAlt	27

Problématique, hypothèse de travail et objectifs	29
2.1 Problématique et hypothèse	29
2.2 Objectifs	29
2.2.1 Objectif #1 Développer un essai de dosage de PACE4-CtCons et PACE4-CtAlt dans le plasma	29
2.2.2 Objectif #2 Comparer les niveaux de PACE4-CtCons et PACE4-CtAlt dans le sang de patients atteints d'un CaP et des patients sains	31
2.2.3 Objectif #3 Comparer les niveaux des deux isoformes de PACE4 dans l'urine	31
Matériels et méthodes	33
3.1 Échantillons cliniques et biobanque.....	33
3.2 Synthèse peptidique	33
3.3 Vecteurs d'expression.....	35
3.4 Culture cellulaire et transfection.....	35
3.5 Marquage isotopique.....	36
3.6 Purification	36
3.7 Dosage protéique.....	37
3.8 Immunobuvardage de type western.....	37
3.9 Immunobuvardage en point	38
3.10 Sélection des billes pour l'immunoprécipitation.....	38
3.11 Biotinylation des anticorps.....	39
3.12 Immunoprécipitation.....	39
3.13 Préparation des échantillons pour l'analyse en spectrométrie de masse	40
3.14 Chromatographie liquide	40
3.15 Spectrométrie de masse en tandem (MS/MS)	41
3.16 Analyses en mode multiple reactions monitoring.....	41
3.17 Multiple Affinity Removal System-14 (MARS 14)	42
3.18 Sage Electrophoretic Lateral Fractionator (ELF)	43
3.19 Digestion trypsique sur gel d'acrylamide.....	44
3.20 Analyses bio-informatiques et statistiques.....	45
Résultats	46
4.1 Optimisation de l'essai pseudoMRM pour détecter PACE4 dans le plasma humain.....	46
4.1.1 Identification, sélection et optimisation des peptides monitorés.....	46
4.1.1.1 Courbes standards des peptides de PACE4.....	49

4.1.2	Déplétion des protéines abondantes du plasma humain	50
4.1.3	Immunoprécipitation couplée à l'analyse pseudoMRM	52
4.1.3.1	Sélection des billes	52
4.1.3.2	Validation des anticorps produits au laboratoire	53
4.1.3.3	Seule l'isoforme PACE4-CtCons est détectable dans le plasma humain	57
4.1.4	Purification de la PACE4 recombinante isotopiquement marquée	59
4.1.4.1	Efficacité du marquage isotopique	62
4.2	Détection de PACE4 dans l'urine de patients atteints d'un CaP	64
4.3	Étude comparative chez des patients sains et atteints d'un CaP	68
4.3.1	Normalité de la distribution des données	71
4.3.2	Somme de l'aire sous la courbe pour comparer les échantillons	72
4.3.3	Comparaison des niveaux de PACE4-CtCons dans les échantillons	74
	Discussion	77
5.1	Méthode pseudoMRM	77
5.2	Déplétion des protéines abondantes	79
5.3	Mise au point de l'essai IP-pseudoMRM	80
5.4	Étude comparative	81
5.4.1	Forces et faiblesses de l'étude	82
5.5	Importance de mettre au point un essai de dosage pour PACE4	84
	Conclusions	86
6.1	Perspectives	86
	Remerciements	88
	Liste des références	89
	Annexes	101
9.1	License d'utilisation des figures provenant de publications	101

LISTE DES FIGURES

Figure 1. Principe du <i>multiple reaction monitoring</i>	14
Figure 2. Algorithme de traitement du cancer de la prostate	17
Figure 3. La famille des proprotéines convertases	21
Figure 4. Localisation subcellulaire des proprotéines convertases	24
Figure 5. Expression de PACE4 dans les tumeurs de la prostate	26
Figure 6. Organisation des domaines structuraux de PACE4 et poids moléculaire	35
Figure 7. Principe du Sage ELF	43
Figure 8. Localisation des peptides de PACE4 identifiés.....	46
Figure 9. Transitions sélectionnées pour le suivi de PACE4 et de l'APS en pseudoMRM ..	48
Figure 10. Courbes standards de peptides	50
Figure 11. Immunodéplétion des protéines abondantes avec un système MARS14	51
Figure 12. Liaison non spécifique de PACE4 sur plusieurs billes magnétiques	52
Figure 13. Expression de PACE4-CtCons et PACE4-CtAlt dans les HEK293FT	54
Figure 14. Validation des anticorps produits au laboratoire	55
Figure 15. Spécificité des anticorps anti-CtConsensus et anti-CtAlternatif	57
Figure 16. Détection de PACE4 dans le plasma humain de patients atteints d'un CaP	59
Figure 17. Purification de PACE4-CtCons isotopiquement marquée	61
Figure 18. Purification de PACE4-CtAlt isotopiquement marquée	62
Figure 19. Efficacité du marquage isotopique de PACE4	63
Figure 20. Détection de PACE4 dans l'urine de patients atteints d'un CaP	65
Figure 21. Immunoprécipitation dans l'urine avec l'anti-domaine P	66
Figure 22. Analyse pseudoMRM des fractions d'élution du Sage ELF	67
Figure 23. Analyse pseudoMRM de la bande à 90 kDa excisée d'un gel de polyacrylamide	68
Figure 24. Analyse séquentielle des 33 prélèvements sanguins inclus dans l'étude	71
Figure 25. Distribution des données	72
Figure 26. Corrélation entre l'AUC totale et l'AUC des transitions individuelles.....	73
Figure 27. PACE4 est un biomarqueur du CaP indépendant de l'APS	76

LISTE DES TABLEAUX

Tableau 1. Anticorps utilisés en immunobuvardage de type western.....	38
Tableau 2. Liste des billes testées pour la sélection	38
Tableau 3. Paramètres du TripleTOF 5600 pour les transitions de PACE4	42
Tableau 4. Peptides de PACE4 et de l'APS identifiés par ProteinPilot.	47
Tableau 5. Dosage protéique des fractions de purification.....	60
Tableau 6. Caractéristiques cliniques des patients inclus dans l'analyse	70
Tableau 7. Test de Shapiro-Wilk pour déterminer la normalité des distributions	71

LISTE DES ABRÉVIATIONS

3'UTR	<i>three prime untranslated region</i>
6-Cl-HOBt	6-chloro-1H-benzotriazol-1-ol
AF	acide formique
APS	antigène prostatique spécifique
AUC	aire sous la courbe
BSA	<i>bovine serum albumin</i>
CaP	cancer de la prostate
CHUS	Centre Hospitalier Universitaire de Sherbrooke
DIPEA	N-éthyl-N-isopropyl-2-propanamine
DMF	N,N-diméthylformamide
DMSO	diméthylsulfoxyde
DTT	dithiothréitol
ELF	<i>Electrophoretic Lateral Fractionator</i>
ELISA	<i>enzyme-linked immunosorbent assay</i>
Fmoc	carbonochloridate de 9H-fluorén-9-ylméthyle
HATU	hexafluorophosphate de (diméthylamino)-N,N-diméthyl(3H-[1,2,3]triazolo[4,5-b]pyridin-3-yloxy) méthaniminium
HPLC	<i>high performance liquid chromatography</i>
IAA	iodoacétamide
IHC	marquage immunohistochimique
IP	immunoprécipitation
IP-pseudoMRM	<i>immunoprecipitation-adapted multiple reaction monitoring</i>
KDS	<i>potassium dodecyl sulfate</i>
m/z	ratio masse sur charge
MARS 14	<i>Multiple Affinity Removal System-14</i>
MRM	<i>multiple reaction monitoring</i>
MS	<i>mass spectrometry</i>
MS/MS	<i>tandem mass spectrometry</i>

NHS	N-hydroxysuccinimide
NIH	<i>National Institutes of Health</i>
PBS	<i>phosphate-buffered saline</i>
PC	proprotéine convertase
PCR	<i>polymerase chaine reaction</i>
PIN	<i>prostatic intra-epithelial neoplasia</i>
SDS	<i>sodium dodecyl sulfate</i>
SILAC	<i>stable isotope labeling by amino acids in cell culture</i>
SPE	<i>solide phase extraction</i>
TBS	<i>tris-buffered saline</i>
TCE	2,2,2 -trichloroéthanol
TFA	acide trifluoroacétique
TIS	triisopropylsilane

INTRODUCTION

Pour plusieurs pathologies, dont en outre le cancer, les manifestations cliniques peuvent être non spécifiques jusqu'à tardivement dans le développement de la maladie, ce qui peut rendre le dépistage et le choix des soins appropriés assez difficiles (Sahu *et al.*, 2011). Ainsi, les biomarqueurs en médecine moderne sont des outils indispensables pour la détection de maladies et pour la prise en charge des patients. Quoique le terme biomarqueur soit relativement nouveau, ils sont utilisés depuis plusieurs siècles. Un exemple de biomarqueur est la température corporelle qui indique qu'un patient fait de la fièvre (Goodsaid et Frueh, 2007). Dans ce mémoire de maîtrise, il sera question de la mise au point d'une méthode pour valider le potentiel de biomarqueurs prometteurs dans le cancer de la prostate (CaP).

1.1 Les biomarqueurs

1.1.1 Définition et caractéristiques

Selon la fonction du biomarqueur (ex. pronostic, diagnostic, réponse au traitement, etc.) ou la spécialité médicale (ex. oncologie, pneumologie, cardiologie, etc.), le terme biomarqueur peut prendre plusieurs définitions. Plus générale, celle proposée par le *National Institutes of Health* (NIH) est : une mesure objective d'un attribut physiologique, évaluant un indicateur de processus biologique normal, un indicateur de processus pathogénique ou une réponse pharmacologique suite au traitement avec un agent thérapeutique (Atkinson A.J. *et al.*, 2001). Les biomarqueurs peuvent prendre plusieurs formes : une protéine, un ARN, un ADN, une modification épigénétique, une modification post-traductionnelle, un métabolite, etc. (Prensner *et al.*, 2012). On dénombre 7 rôles majeurs attribués aux biomarqueurs en médecine : le dépistage, le diagnostic d'une pathologie, l'évaluation du pronostic de la maladie, la description de la disposition envers une maladie pour un patient donné, l'aide aux choix thérapeutiques, le suivi de la maladie ou la description de la prédisposition pharmacogénomique d'un patient (Prensner *et al.*, 2012; Sawyers, 2008). Un marqueur biologique idéal est préférablement exprimé exclusivement au site de l'organe atteint, prélevé par la voie la moins invasive (par exemple : urine ou prélèvement sanguin), mesurable facilement et sécuritairement, et devrait apporter des réponses dans le contexte pathologique pour la prise de décision. De plus, il devrait être très sensible (c.-à-d. une proportion élevée

des personnes atteintes de la pathologie en question devrait avoir un test positif) et très spécifique (c.-à-d. une proportion élevée des personnes saines devraient avoir un test négatif) pour la pathologie et avoir des valeurs prédictives positives et négatives élevées (valeurs mesurant les performances de l'essai à discriminer les vrais positifs et les vrais négatifs des faux positifs et faux négatifs) (Prensner *et al.*, 2012).

1.1.2 Étapes de la validation d'un biomarqueur

La découverte et la validation d'un biomarqueur peuvent être réparties en 5 phases distinctes qui s'apparentent aux phases des essais cliniques (Pepe *et al.*, 2008; Ransohoff, 2007). Tout d'abord, la première phase est la découverte du biomarqueur. Dans cette phase, il est important de décrire les patrons d'expression du biomarqueur autant dans des conditions pathologiques que saines dans l'organisme entier et de s'assurer de la spécificité tissulaire ou pathologique du candidat. Il faut également connaître l'étendue des niveaux retrouvés dans les échantillons biologiques ainsi que les niveaux moyens dans l'organisme. La deuxième phase est de développer l'essai de dosage du marqueur. Idéalement, l'essai est facile à faire, non invasif pour le patient et reproductible. En plus, il ne devrait y avoir aucune variation des résultats en fonction de facteurs confondants comme l'âge ou le sexe. La troisième phase consiste en l'élaboration et la conduite d'études rétrospectives qui vont évaluer les performances de l'essai à discriminer l'issue pathologique désiré. Des informations comme les valeurs de spécificité et de sensibilité ainsi que les valeurs prédictives positives et négatives pourront être calculées. Les quatrième et cinquième phases sont les études prospectives et l'analyse de l'impact du nouvel outil diagnostique sur le système de santé en ce qui concerne les coûts ou les vies sauvées.

1.1.3 Méthodes d'étude des biomarqueurs

La méthode utilisée pour doser un biomarqueur dépend largement de la nature du biomarqueur (protéine, ADN, ARN, etc.), de l'application clinique (qualitatif, quantitatif, etc.) ainsi que des limites propres aux technologies employées (sensibilité, spécificité, choix des composantes de l'essai (ex. anticorps), etc.) (Chau *et al.*, 2008). Les technologies à haut débit comme le séquençage, les puces à ADN ou la spectrométrie de masse (MS) sont intéressantes pour l'étude des biomarqueurs puisqu'elles permettent de doser plusieurs biomarqueurs potentiels en parallèle permettant d'identifier plus d'un candidat dans une

même expérience. Les méthodes à haut débit sont toutefois largement dépendantes des librairies (séquençage, puces à ADN) ainsi que des bases de données utilisées pour l'alignement des séquences et pour l'identification des marqueurs. De plus, les candidats identifiés doivent habituellement être validés par des méthodes ciblées comme l'amplification en chaîne par polymérase (PCR) quantitative ou par ELISA (*enzyme-linked immunosorbent assay*). D'ailleurs, ce sont ces méthodes ciblées qui sont largement utilisées en clinique puisqu'elles sont sensibles, spécifiques et très reproductibles (Chau *et al.*, 2008). De plus, la mesure faite par ces techniques est pertinente pour la prise en charge du patient en clinique puisqu'elle est compréhensible pour un clinicien (ng/L, mmol/L, etc.) et peut facilement être comparée au seuil de normalité établie en clinique.

1.1.3.1 Méthode sélective en spectrométrie de masse pour l'étude des biomarqueurs

Le développement de modes d'analyse ciblés sur ces plateformes technologiques offre plusieurs avantages pour l'étude des biomarqueurs. Dans ce sens, le mode d'analyse MS nommé *multiple reaction monitoring* (MRM) permet de faire l'analyse de biomarqueurs avec une spécificité et une sensibilité comparable aux essais immunologiques (Figure 1) (Picotti et Aebersold, 2012). L'un des grands avantages de l'analyse MRM est la capacité de multiplexer les analyses. De ce fait, les transitions de plus d'une protéine peuvent être suivies et doser en parallèle dans le même échantillon augmentant le pouvoir d'analyse de l'essai. De plus, avec l'ajout de peptides standards isotopiquement marqués dans les échantillons, il est possible de quantifier les analytes d'intérêts de façon absolue, contrairement aux analyses MS standards, où la quantification est plutôt relative (Picotti et Aebersold, 2012). Un désavantage est que chaque méthode doit être optimisée individuellement pour obtenir la sensibilité optimale, mais cela est fait relativement rapidement par l'infusion des peptides synthétiques.

Dans une analyse en mode MRM, les ions précurseurs sont filtrés en Q1 et les ions produits, générés par la fragmentation des ions précurseurs au niveau de la cellule de collision (Q2) du spectromètre de masse, sont suivis sélectivement grâce à l'analyseur en Q3 (Picotti et Aebersold, 2012). Le détecteur de l'appareil permet d'obtenir des chromatogrammes spécifiques aux transitions (ion précurseur/ion produit) sélectionnées et l'aire sous la courbe

(AUC) du pic d'intérêt est directement proportionnelle à la quantité du peptide dans l'échantillon.

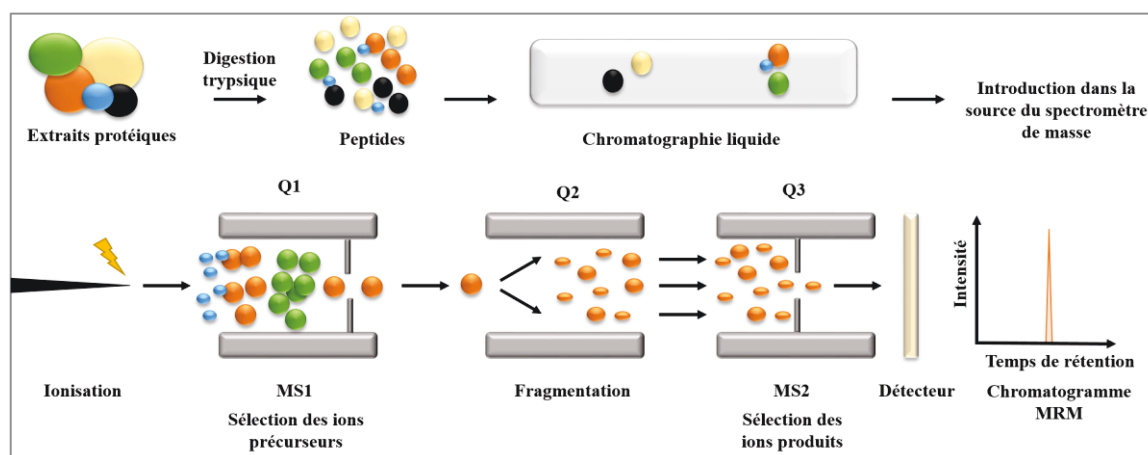


Figure 1. Principe du *multiple reaction monitoring*

Comme l'analyse MS standard, les peptides issus d'une digestion trypsique sont introduits dans la source d'un spectromètre de masse suite à leur séparation par chromatographie liquide. Une première analyse MS (MS1) est effectuée en Q1 sur les peptides ionisés en fonction du ratio masse sur charge (m/z) et une sélection des ions précurseurs d'intérêts est faite à ce niveau. Tous les ions ayant le m/z d'intérêts poursuivent leur chemin à la cellule de collision en Q2, où les peptides ionisés sont fragmentés en ions produits. Une seconde analyse MS (MS2) est faite en Q3 sur les ions produits. En mode MRM, les ions produits d'intérêt sont à nouveau filtrés en Q3 pour être détectés au détecteur, produisant ainsi un chromatogramme de l'intensité du signal en fonction du temps de rétention de la chromatographie liquide pour les transitions (ion précurseur/ion produit) sélectionnées.

1.1.4 Exemples de biomarqueurs en oncologie

Les biomarqueurs sont utilisés dans toutes les sphères de la médecine, mais sont particulièrement importants en oncologie. Le dosage de l'alpha-fœtoprotéine (AFP) pour le dépistage du cancer hépatique (Bialecki et Di Bisceglie, 2005), le dosage de l'antigène CA-125 pour le criblage du cancer de l'ovaire (Sundar *et al.*, 2015), l'analyse de sang occulte dans les selles pour le dépistage du cancer colorectal (Benton *et al.*, 2015) et le dosage de l'acide vanylmandélique et de l'acide homovanillique pour le dépistage des neuroblastomes chez les nouveau-nés (Owens et Irwin, 2012) sont tous des tests couramment utilisés en oncologie. Dans le même ordre d'idée, un autre exemple populaire est le dosage de l'antigène prostatique spécifique (APS) pour le dépistage du CaP. Toutefois, ce test a été remis en question et il est maintenant l'objet d'une polémique mondiale, car il ne permet pas de

distinguer les cancers de la prostate indolents de ceux cliniquement significatifs (Collège des médecins du Québec, 2013; Schroder *et al.*, 2012).

1.2 Le cancer de la prostate

1.2.1 Épidémiologie

Au Canada, le CaP représente en 2015 la forme de cancer la plus prévalente chez l'homme et la cinquième cause de mortalité par cancer (Comité consultatif de la Société canadienne du cancer, 2015). De ce fait, il est estimé qu'un homme sur 8 sera atteint d'un CaP dans sa vie tandis que 1 homme sur 27 en mourra. Parmi les facteurs de risque du CaP, l'âge est sans contredit le facteur le plus important. De ce fait, la prévalence de CaP non diagnostiqué à l'autopsie est d'au-delà de 20 % pour la tranche d'âge 40-49 ans et grimpe à tout prêt de 50 % chez les hommes âgés de plus de 80 ans (Jahn *et al.*, 2015). Un historique familial de CaP contribue fortement à l'augmentation du risque de développer un CaP. En conséquence, les hommes qui ont des proches atteints d'un CaP (parents de premiers degrés : père ou frères) ont plus de risques d'avoir un diagnostic de CaP au cours de leur vie (Albright *et al.*, 2015). Le risque relatif est de 2,48 si 1 seul membre de la famille est atteint et ce risque peut grimper jusqu'à 7,65 si 4 membres de la famille immédiate sont atteints du CaP. La race influence également le risque de développer un CaP. Il est estimé qu'il y a 2 x plus de nouveaux cas de CaP en 2015 chez les hommes de race noire comparativement aux hommes caucasiens (taux d'incidence par 100 000 de population ajusté pour l'âge : 208,7 vs 123,0 nouveaux cas, respectivement) tandis que ce risque est diminué de moitié pour les asiatiques (67,8 nouveaux cas par 100 000 de population) (Siegel *et al.*, 2016).

1.2.2 Prédisposition génétique

Ces facteurs de risques suggèrent qu'il pourrait y avoir une composante génétique prédisposant certains hommes à développer un CaP. De ce fait, des études d'association pangénomique ont maintenant identifié plus de 90 polymorphismes nucléotidiques fréquemment détectés qui expliqueraient dans l'ensemble près d'un tiers du risque héréditaire de développer un CaP (Demichelis et Stanford, 2014; Eeles *et al.*, 2013). De plus, il a été montré qu'une accumulation de polymorphismes nucléotidiques sur le génome augmenterait le risque de développer le CaP (Eeles *et al.*, 2013). D'un autre côté, certains polymorphismes plus rares ont une pénétrance très importante. Par exemple, certaines mutations causant la

perte de fonction dans les gènes *breast cancer-1* et *-2* (*BRCA1* et *BRCA2*), gènes impliqués dans la réparation des dommages à l'ADN, sont associées à un risque jusqu'à 3,5 x plus élevé de développer un CaP pour *BRCA1* et jusqu'à 8,6 x plus élevé pour *BRCA2* chez des hommes âgés de plus de 65 ans (Helfand et Catalona, 2014). Ces mutations sont toutefois des événements assez rares, étant détectables dans environ 0,3 % des cancers sporadiques (Helfand et Catalona, 2014). Les modifications épigénétiques seraient aussi impliquées dans la prédisposition au CaP (Damaschke *et al.*, 2013). Dans le cancer en général, il y a une hypométhylation globale du génome ainsi qu'une hyperméthylation site-spécifique, associée à la répression génique (Esteller, 2007). Dans les cas de CaP, la méthylation de l'ADN prostatique tend à décroître en fonction du stade pathologique (Bedford et Van Helden, 1987; Yegnasubramanian *et al.*, 2008). Il est même suggéré que l'hypométhylation du génome serait un mécanisme précédant la tumorigénèse puisque l'ADN des lésions prénéoplasiques de PIN (*prostatic intra-epithelial neoplasia*) est légèrement hypométhylé comparativement aux tissus sains. Quelques gènes sont hyperméthylés dans le CaP inactivant par le fait même leur expression, par exemple : le gène *androgen receptor* (*AR*), le gène *estrogen receptor 2* (*ESR2*) ou le gène *multidrug resistance protein 1* (*MDR1*) (Li *et al.*, 2004). Dans l'ensemble, la composante génétique ne peut être négligée dans les facteurs de risque du CaP, mais malheureusement, elle n'a toujours pas d'application clinique.

1.2.3 Dépistage et diagnostic

Le CaP est un type de cancer à progression généralement lente et dépendant des androgènes (Figure 2) et donc le dépistage y est approprié. Selon les dernières recommandations du Collège des Médecins du Québec datant de juin 2013, '*les médecins doivent envisager le dépistage du cancer de la prostate chez leurs patients âgés de 55 à 70 ans ayant une espérance de vie de plus de 10 ans et peuvent l'envisager avant l'âge de 55 ans chez leurs patients à plus haut risque de cancer de la prostate (antécédents familiaux ou de race noire). (Recommandation faible)*'. De plus, '*Les médecins ne doivent pas proposer le dépistage du cancer de la prostate à leurs patients âgés de plus de 70 ans, ni à ceux dont l'espérance de vie est estimée à moins de 10 ans. (Recommandation forte) Les médecins devraient faire un toucher rectal aux patients qui optent pour le dépistage, en plus du dosage de l'antigène prostatique spécifique (APS). (Recommandation faible)*' (Collège des médecins du Québec, 2013). Le diagnostic lui est fait par biopsies principalement par voie transrectale.

1.2.3.1 Antigène prostatique spécifique

L'APS est une protéase à sérine sécrétée par l'épithélium prostatique qui se retrouve en grande concentration (0,3-3 g/L) dans le sperme (Lilja *et al.*, 2008). Cette glycoprotéine de la famille des kallikréines a la fonction essentielle de liquéfier le sperme suite à l'éjaculation, facilitant le déplacement des spermatozoïdes, en clivant des substrats comme la semenogeline I et II (Lilja, 1985; Lilja *et al.*, 1987). Sans l'action de l'APS, le liquide séminal forme immédiatement un caillot en conséquence de la composition protéique de ces sécrétions. En temps normal, l'APS peut être mesuré dans le sérum à des concentrations faibles. La concentration sérique moyenne pour des patients sans antécédent de problèmes prostatiques et ayant un toucher rectal normal, est de $1,1 \pm 0,7 \mu\text{g/L}$ (Stamey *et al.*, 1987). Le niveau d'APS dans le sang augmente lors d'une affection de la prostate, soit une condition bénigne telle que l'hyperplasie de la prostate, une prostatite ou une rétention urinaire, soit un cancer. L'APS est donc un biomarqueur intéressant, mais non spécifique au CaP.

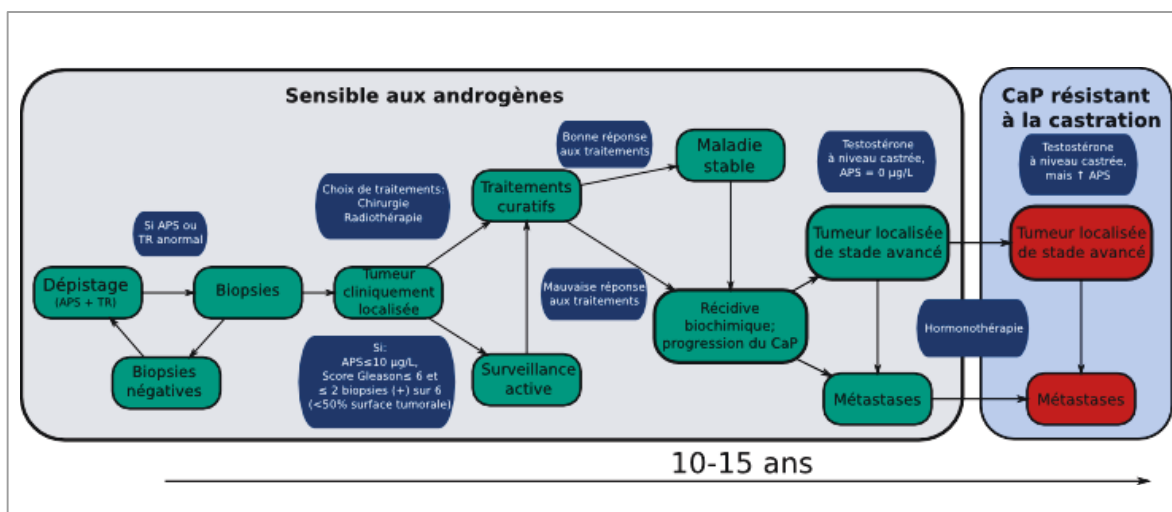


Figure 2. Algorithme de traitement du cancer de la prostate

La progression du CaP est généralement lente. La tumeur peut être indolente pour l'entièreté de la vie d'un patient néanmoins, dans certains cas, le CaP peut progresser jusqu'à la formation de métastases et causer la mort. Dans les premiers stades de la pathologie, le cancer est sensible aux androgènes. Les différents traitements offerts vont ainsi cibler cette faiblesse. Cependant, le CaP peut surmonter cette dépendance et devenir résistant à la castration.

1.2.3.2 Histoire de l'APS comme outil de dépistage du cancer de la prostate

L'APS fut découvert vers la fin des années 1960, mais ne fut détecté pour la première fois qu'en 1980, par Lawrence D. Papsidero, dans le sérum de patients ayant un CaP métastatique (Rao *et al.*, 2008). En 1987, le groupe de recherche de Thomas A. Stamey a démontré la corrélation entre le niveau d'APS dans le sérum et le stade clinique du CaP. Ils ont aussi observé que les niveaux d'APS étaient indétectables suite à la prostatectomie radicale (Rao *et al.*, 2008; Stamey *et al.*, 1987). Ce fut la première étude d'envergure suggérant l'utilité clinique de l'APS comme biomarqueur pour le suivi du CaP. Le dosage de la phosphatase acide prostatique (PAP), méthode auparavant utilisée pour le dépistage du CaP, fut donc rapidement remplacé par l'APS dans le milieu des années 1980. Suite à l'introduction du test de l'APS en clinique, l'incidence du CaP a dramatiquement augmenté dans les années 1990 (Siegel *et al.*, 2016). L'APS permet de dépister un plus grand nombre de CaP à des stades plus précoces.

1.2.3.3 Limites de l'APS pour le dépistage

Cependant, tel que déjà mentionné, l'APS n'est pas un biomarqueur parfait, il est non spécifique au CaP. En effet, la libération de l'APS dans le sang est le résultat d'un remodelage de l'architecture tissulaire de la prostate (Lilja *et al.*, 2008). Ainsi, une augmentation de l'APS dans le sang peut être le résultat d'un trouble bénin comme une hyperplasie bénigne de la prostate, une prostatite ou même un massage prostatique (Lilja *et al.*, 2008). Il est estimé que le taux de dépistage du CaP par l'APS en combinaison avec le toucher rectal est de 23-37 % en fonction de l'ethnicité, si la valeur limite supérieure de normalité est de 4 µg/L, la valeur utilisée dans la plupart des cliniques au Canada (Catalona *et al.*, 1994, 1993). C'est donc dire que pour 3 biopsies sur 4, réalisées en raison d'un niveau d'APS ou un toucher rectal jugé anormal, le patient n'a pas de CaP et aurait pu éviter les inconvénients de la biopsie. De plus, le dépistage à grande échelle par l'APS prévient très peu la mortalité par CaP. Effectivement, les résultats de l'étude clinique randomisée *European Randomized Study of Screening for Prostate Cancer* (ERSPC) a démontré qu'il fallait dépister à l'aide de l'APS environ 1055 patients et diagnostiquer 37 CaP pour sauver 1 vie (Collège des médecins du Québec, 2013; Schroder *et al.*, 2012). Ainsi, l'utilité clinique de l'APS pour le dépistage du CaP cliniquement significatif est remise en question et cela crée une polémique au sein des professionnels de la santé. Les groupes de recherche en santé préventive comme le collège

des médecins du Québec (Collège des médecins du Québec, 2013), le groupe canadien d'étude sur les soins de santé préventifs (Krahn, 2014) ou le *U.S. preventive service task force* (Lin *et al.*, 2011) déconseillent désormais le dosage de l'APS pour dépister le CaP. À l'opposé, certains urologues et experts critiquent ces rapports invoquant que le retrait du test de l'APS en clinique au dépistage, faute de meilleurs biomarqueurs disponibles, constitue un retour en arrière, où les patients étaient dépistés plus souvent à des stades avancés de la maladie (Witte *et al.*, 2015). Selon eux, le dépistage précoce de la maladie est plus important pour que le traitement des patients soit optimal et l'APS répond amplement à ce critère. Il y a par conséquent un grand besoin de nouveaux biomarqueurs permettant de remplacer ou compléter l'APS afin d'avoir un test plus spécifique au CaP qui pourrait réduire le nombre de biopsies invasives faites inutilement, mais surtout des traitements pouvant perturber significativement la qualité de vie des patients par leurs complications. L'APS demeure tout de même utile pour le suivi des patients post-diagnostic.

1.2.4 Pronostic

Les opposants au retrait de l'APS pour le dépistage soulèvent également un second point important en affirmant que le réel besoin clinique n'est pas au niveau du dépistage systématique, mais bien au niveau de la prise en charge et le pronostic du CaP (Witte *et al.*, 2015). En effet, le CaP est surdiagnostiqué. Les études sur la prévalence du CaP à l'autopsie démontrent que plus de 50 % des personnes âgées de 80 ans ou plus, décédées d'une cause autre que le CaP et qui n'ont jamais eu de suivi clinique pour un CaP au cours de leur vie, ont des lésions cancéreuses à la prostate (Jahn *et al.*, 2015). C'est donc dire que plusieurs tumeurs demeurent localisées et asymptomatiques pour l'entièreté de la vie du patient. De plus, pour ces tumeurs indolentes diagnostiquées en clinique, les patients ne bénéficient aucunement des traitements curatifs comme la prostatectomie radicale ou la radiothérapie (Romero-Otero *et al.*, 2016), qui ont des effets secondaires non négligeables sur la qualité de vie comme la dysfonction érectile, la dysfonction urinaire ainsi que des cystites et rectites radiques (Resnick *et al.*, 2013). En clinique, aucun outil ne permet de dépister les tumeurs indolentes des CaP mortels. En plus, le CaP de stade avancé peut surmonter le manque d'androgènes et devenir résistant à la castration (Figure 1). Il peut par la suite progresser davantage au niveau des ganglions pelviens et métastaser à des sites distants, plus fréquemment aux os, au foie et plus rarement aux poumons, pour finalement causer la mort

du patient (Bubendorf *et al.*, 2000). Le taux de survie à 5 ans post-diagnostic chez les patients ayant une tumeur localisée s'élève à tout près de 99 % (Siegel *et al.*, 2016). Cependant, si le cancer progresse, devient métastatique et surtout s'il devient résistant à la castration, le taux de survie du CaP à 5 ans chute drastiquement à 25 % (Locke et Black, 2016). Ces observations illustrent très bien l'un des grands besoins cliniques actuels, un biomarqueur ou un outil pouvant discriminer les tumeurs indolentes des tumeurs cliniquement agressives. Par le fait même, cet outil permettra d'améliorer la prise en charge des patients et de traiter uniquement les tumeurs considérées cliniquement significatives pour ainsi réduire le surtraitement du CaP avec les conséquences néfastes sur la qualité de vie des patients qui lui sont associées.

1.2.4.1 Surveillance active

Depuis quelques années, les patients atteints d'un CaP à faible risque se voient conseiller par les urologues de suivre un protocole de surveillance active, qui consiste principalement en un suivi de l'APS et du toucher rectal aux 6-12 mois ainsi que d'une seconde biopsie, 1 an et 4 ans après la première biopsie, si l'APS ou le toucher rectal n'ont pas changé significativement (Chen *et al.*, 2016). Quelques critères doivent être satisfaits pour qu'un patient puisse être en surveillance active soit : un score de Gleason à la biopsie ≤ 6 (indice sur une échelle de 6-10, décrivant l'agressivité des tumeurs sur les coupes histologiques de tissus, 6 étant moins agressif et 10 étant le plus agressif), ≤ 2 biopsies positives sur un minimum de 6 biopsies dont chacune d'entre elles contient moins de 50 % de cancer et finalement, un APS $\leq 10 \mu\text{g/L}$. (Figure 2) (Romero-Otero *et al.*, 2016). Après un temps moyen de 2,5 années et pour environ le tiers des patients enrôlés dans un protocole de surveillance active, une seconde thérapie, soit la chirurgie ou la radiothérapie, doit être administrée aux patients sur la base d'un changement histologique à la biopsie ou un temps de dédoublement de l'APS inférieur à 3 ans (Dall'Era *et al.*, 2012).

1.3 Les proprotéines convertases

Il est maintenant établi que certains membres de la famille des proprotéines convertases (PCs) ont un rôle déterminant dans le cancer. Cette famille d'endoprotéases à sérine comprend 9 membres soit : PC1/3, PC2, Furine, PACE4, PC4, PC5/6, PC7, PCSK9 et SKI-1/S1P (Figure 3). PC5/6 a 2 isoformes issues de l'épissage alternatif de son ARN messager : une

isoforme plus courte, PC5/6A, qui est sécrétée et une isoforme plus longue, PC5/6B, qui possède un domaine transmembranaire (Seidah et Prat, 2012). La fonction des PCs est l'endoprotéolyse de précurseurs protéiques au sein des voies de sécrétion et elle est essentielle pour la maturation ou l'inactivation de protéines et peptides bioactifs (Bergeron *et al.*, 2000; Couture *et al.*, 2011; Seidah et Prat, 2012). Plusieurs substrats des PCs sont impliqués dans des processus associés au développement, à la progression et au maintien des tumeurs (Bassi *et al.*, 2005), par exemple : les facteurs de croissance *insulin-like growth factor -1 et -2* (IGF-1 et IGF-2) ainsi que leurs récepteurs (IGFR) qui sont impliqués dans le maintien des capacités prolifératives du cancer et dans la résistance à l'apoptose ; le facteur de croissance de l'endothélium vasculaire (VEGF) qui est important pour l'initiation de l'angiogenèse; ou les métalloprotéases de type membranaire (MT-MMP) et de la famille des ADAM, essentielles pour l'invasion tissulaire des tumeurs et la formation des métastases.

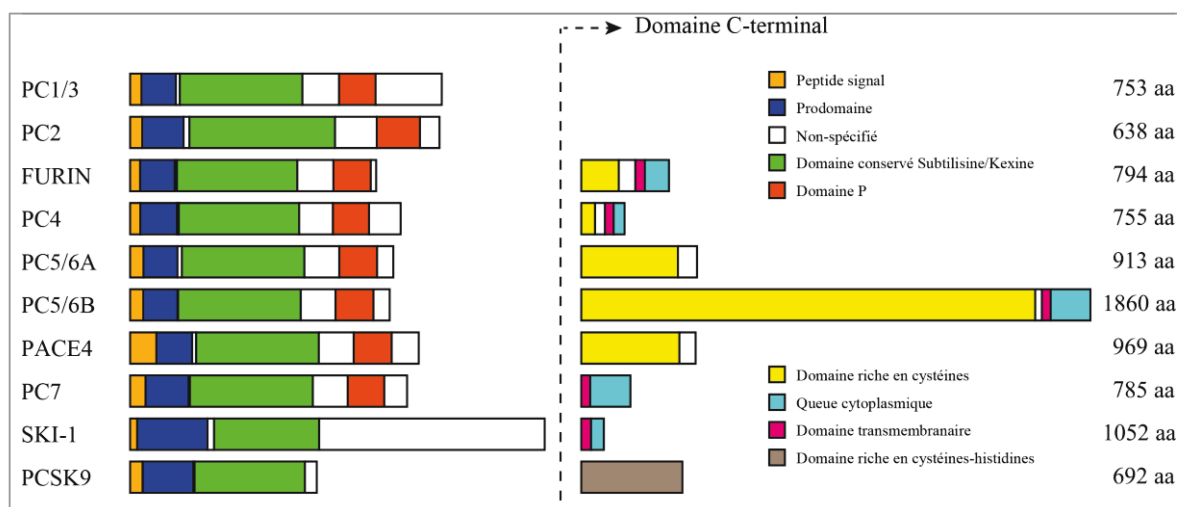


Figure 3. La famille des proprotéines convertases

Les 9 membres formant la famille des PCs ont des domaines fonctionnels et structuraux similaires, mais une extrémité carboxy-terminale (C-terminale) variable. Cette variabilité confère aux différents membres une spécificité pour certains substrats étant donné qu'elle influence leur localisation subcellulaire. Figure emprunté de la thèse de (Ly, 2016).

1.3.1 Domaines structuraux conservés et maturation

In vitro, il y a une grande redondance fonctionnelle pour les substrats ciblés par les PCs, étant donné que la majorité des domaines structuraux et fonctionnels sont conservés à travers la famille (Couture *et al.*, 2011; Creemers et Khatib, 2008; Lapierre *et al.*, 2007; Seidah *et al.*,

1994; Seidah et Prat, 2012). Ces domaines sont le peptide signal, le prodomaine, le domaine catalytique et le domaine P.

1.3.1.1 Le peptide signal

Les PCs sont initialement traduites en zymogènes inactifs et sont maturées dans les voies de sécrétions (Bergeron *et al.*, 2000). Le peptide signal dirige les PCs vers le réticulum endoplasmique et il est rapidement clivé par une signal peptidase à la surface du réticulum endoplasmique (Seidah et Prat, 2012).

1.3.1.2 Le prodomaine

Le prodomaine est un domaine chaperon pour la maturation des PCs (Eder *et al.*, 1993; Shinde et Inouye, 1993). Il est important pour le bon repliement des PCs en leur conformation active au niveau du réticulum endoplasmique. Pour favoriser l'expédition des PCs hors du réticulum endoplasmique, le prodomaine doit subir un double clivage autocatalytique (Creemers *et al.*, 1993; Goodman et Gorman, 1994; Lamango *et al.*, 1999; Leduc *et al.*, 1992; Matthews *et al.*, 1994). Le premier clivage s'effectue immédiatement après le repliement de l'enzyme en une conformation active. Le prodomaine demeure toutefois logé dans la pochette catalytique agissant également comme inhibiteur intramoléculaire. Ainsi, l'enzyme reste inactive jusqu'à ce que celle-ci atteigne le compartiment cellulaire ayant le pH et la concentration calcique optimaux pour effectuer le second clivage et gagner sa pleine activité (Bergeron *et al.*, 2000).

1.3.1.3 Le domaine catalytique

La pochette catalytique est hautement conservée à travers les PCs (Fugère et Day, 2005). La triade histidine, serine et acide aspartique est essentielle pour l'activité enzymatique de cette famille. Hormis SKI-1, le clivage protéolytique par les PCs s'effectue sur des sites de reconnaissance multibasique, ayant une séquence consensuelle : R/K-X_n-R/K↓R, ou ↓ représente le site de clivage et X_n = 0, 2, 4 ou 6 résidus. Pour SKI-1, le clivage se fait plutôt sur un site non basique ayant pour séquence : R-X-(L/V/I)-X↓, ou ↓ est le site de clivage et X n'est pas une cystéine ou une proline.

1.3.1.4 Le domaine P

Le domaine P serait essentiel pour la stabilité, la dépendance au calcium et la sensibilité au pH des PCs (Zhou *et al.*, 1998). La structure secondaire de ce domaine est organisée en feuillet bêta et interagit avec le domaine catalytique pour en stabiliser l'architecture (Lipkind *et al.*, 1998). L'importance de ce domaine a été démontrée dans la lignée cellulaire LoVo qui possède une mutation au niveau du domaine P du gène *PCSK3* (encodant pour la Furine) rendant cette enzyme inactive (Takahashi *et al.*, 1993, 1995).

1.3.2 Localisation cellulaire et distribution tissulaire

Contrairement aux autres domaines, l'extrémité C-terminale est assez variable. À cette extrémité, différentes structures peuvent être retrouvées telles qu'un domaine transmembranaire, un domaine riche en cystéines ou un domaine riche en cystéines-histidines. La localisation cellulaire des PCs est différente entre les membres de la famille selon les domaines présents à cette extrémité (Figure 4) (Henrich *et al.*, 2005). PC1/3 et PC2 sont localisées dans les granules denses de sécrétion immatures et matures (Malide *et al.*, 1995). Furine (Thomas, 2002), PC5/6B (Xiang *et al.*, 2000) et PC7 (Declercq *et al.*, 2012) transitent entre le réseau trans-golgien et la surface cellulaire par les endosomes. Furine est également partiellement libérée dans le milieu extracellulaire (Plaimauer *et al.*, 2001). PC7 peut atteindre la membrane directement à partir du réticulum endoplasmique par un mécanisme non conventionnel indépendant de la COPII et insensible à la bréfeldine A (Rousselet *et al.*, 2011). PC5/6A et PACE4 sont sécrétées dans le milieu et peuvent interagir par le domaine riche en cystéines avec les inhibiteurs tissulaires des métalloprotéases (TIMPs) ou les protéoglycanes à sulfate d'héparane (HSPG) présents à la surface cellulaire (Nour *et al.*, 2005). PCSK9 est sécrétée (Poirier *et al.*, 2016) tandis que SKI-1 se retrouve au niveau de l'appareil de Golgi *cis* et médial, dans les endosomes et dans les lysosomes (Pullikotil *et al.*, 2007).

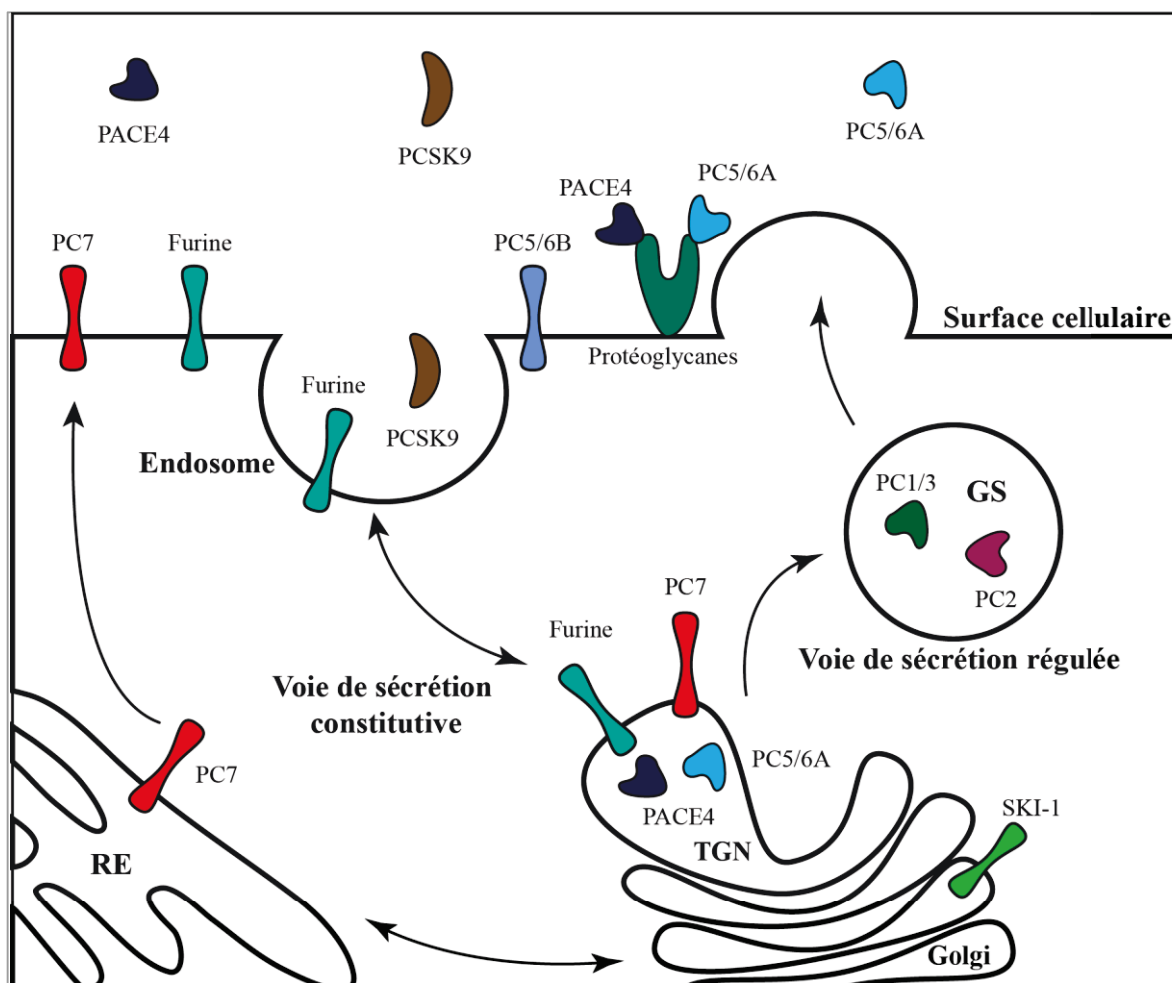


Figure 4. Localisation subcellulaire des proprotéines convertases

Furine, PC7 et PC5/6 B sont liées à la membrane cellulaire tandis que PCSK9, PACE4 et PC5/6A sont sécrétées. PACE4 et PC5/6A peuvent également interagir avec les TIMPs et les HSPG à la surface de la cellule pour y rester ancrées. PC1/3 et PC2 sont localisées dans les granules denses de sécrétions de la voie régulée et SKI-1 demeure au niveau du Golgi médian. RE : Réticulum endoplasmique ; TGN : réseau trans-golgien ; GS : granules de sécrétion. Adapté de (Seidah et Prat, 2012).

L'expression tissulaire est également très variée à travers la famille (Bergeron *et al.*, 2000). Furine, PC7 et SKI-1 sont ubiquitaires dans l'organisme, PACE4 et PC5/6 sont exprimées dans plusieurs tissus tandis que PC1/3 et PC2 sont confinées dans les cellules endocrines et neuroendocrines. PC4 est uniquement exprimée dans les cellules germinales du testicule chez l'homme et dans le placenta et l'ovaire chez la femme (Gyamera-Acheampong et Mbikay, 2009). Enfin, PCSK9 est principalement exprimée dans le foie, le petit intestin et le rein (Bergeron *et al.*, 2000).

1.3.3 Rôle unique de PACE4 dans le cancer de la prostate

1.3.3.1 Surexpression de PACE4 dans les tissus

In vivo, la spécificité des PCs pour différents substrats est fortement associée au domaine C-terminale ainsi qu'à l'expression tissulaire propre à chaque membre. En conséquence, les PCs peuvent avoir des rôles distincts dans les divers processus physiologiques et pathologiques. Notre laboratoire s'intéresse plus particulièrement à l'impact des PCs dans le CaP. La première étude démontrant l'importance des PCs dans le CaP remonte aux travaux de recherche de Katsunori Uchida en 2003. Il a démontré que le traitement de cellules LNCap, une lignée cellulaire de CaP sensible aux androgènes qui a été extraite d'une métastase ganglionnaire (Horoszewicz *et al.*, 1983), avec un inhibiteur non sélectif des PCs entraînait une réduction du clivage du facteur de différenciation PDF (*prostate derived factor*), un membre de la famille des cytokines TGFβ (*transforming growth factor β*), en sa forme active (Uchida *et al.*, 2003). Des études avaient auparavant montré l'implication de la super famille des TGFβ dans la tumorigénèse et la progression tumorale du CaP (Barrack, 1997; Lee *et al.*, 1999; Wikström *et al.*, 2001). Une autre étude faite en 2009 a analysé l'expression de plus de 52 000 transcrits sur une micropuce pour identifier une liste de plus de 1000 gènes surexprimés dans le CaP. Dans la liste, 23 candidats potentiels ont été validés par amplification en chaîne par polymérase (PCR) quantitative et en tout, la surexpression de 15 gènes, dont *PCSK6* (encodant pour PACE4), a été démontrée dans les tissus prostatiques tumoraux comparativement aux tissus sains (Arredouani *et al.*, 2009). Par suite, ces études supportaient l'initiative d'étudier plus en profondeur l'implication individuelle des PCs dans le CaP. Le laboratoire du Pr Robert Day a ainsi été le premier à montrer le rôle unique de PACE4 dans le CaP au sein de la famille des PCs. Tout d'abord, l'analyse de l'expression des différentes PCs par PCR quantitative a révélé que PACE4 est la seule PC surexprimée parmi les membres de la famille dans les tissus prostatiques cancéreux en comparant à des tissus normaux, les autres membres de la famille étant légèrement réprimés (Figure 5A) (D'Anjou *et al.*, 2011). En plus, l'expression de PACE4 augmente en fonction du stade pathologique (Figure 5A) et la surexpression corrèle avec le score de Gleason pathologique (résultats non publiés). L'hybridation *in situ* de l'ARN messager (D'Anjou *et al.*, 2011) et le marquage immunohistochimique (IHC) (Kang *et al.*, 2014) de la protéine, effectués sur des coupes de tissus supportent également cette conclusion (Figure 5).

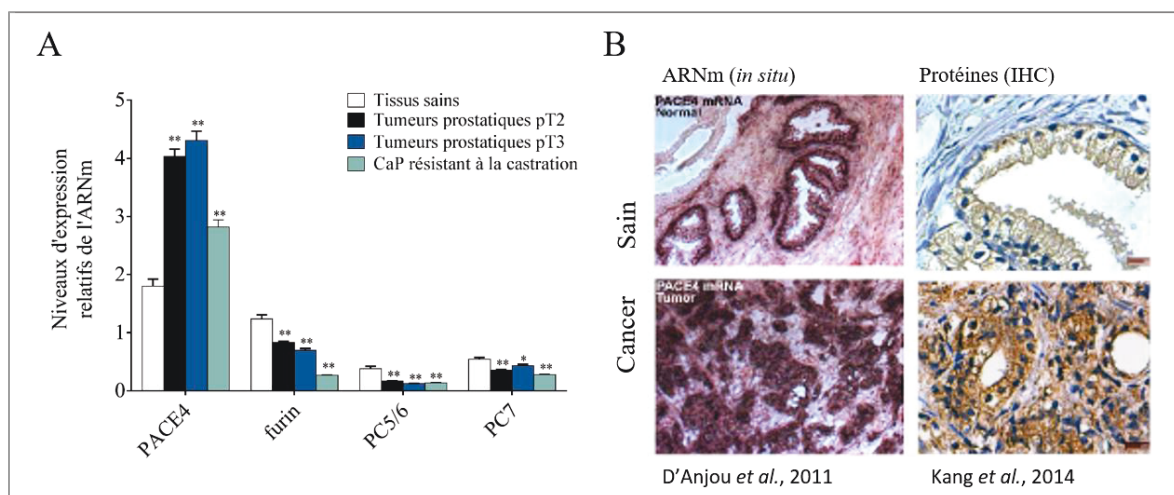


Figure 5. Expression de PACE4 dans les tumeurs de la prostate

A) L'analyse en PCR quantitative de tissus prostatiques normaux et tumoraux, de différents stades pathologiques (pT2 : tumeur palpable confinée à la prostate, pT3 : tumeur avec extensions extracapsulaires) révèle que PACE4 est surexprimée dans le CaP comparativement aux tissus sains adjacents. Pour les autres membres de la famille exprimés dans la prostate, on observe une légère diminution de l'expression (D'Anjou *et al.*, 2011). **B)** La surpression de PACE4 est aussi observable par hybridation *in situ* (D'Anjou *et al.*, 2011) et par marquage immunohistochimique (Kang *et al.*, 2014).

1.3.3.2 PACE4 est dosable dans le sang

Avec un essai MRM, un groupe de recherche a fait la démonstration qu'il est possible de détecter PACE4 dans le sérum (Klee *et al.*, 2012). L'étude exploratoire de ce groupe a comparé les niveaux dans le sérum de 16 biomarqueurs candidats chez des patients atteints d'un CaP de stade avancé et chez des patients sains. Les niveaux étaient généralement plus élevés chez les patients atteints d'un CaP que chez les patients contrôles pour 6 des 16 candidats, dont en autres PACE4. Cependant, leur analyse comparative ne faisait pas la démonstration complète de son potentiel comme biomarqueur du CaP, c'est-à-dire qu'ils n'ont fait aucune association entre les niveaux de PACE4 et différentes données cliniques et pathologiques intéressantes en clinique pour CaP.

1.3.3.3 Influence de PACE4 sur la tumorigénèse et la progression du CaP

Le développement d'un ribozyme de l'hépatite delta dirigé contre PACE4 pour réprimer son expression a démontré l'importance de PACE4 pour la croissance et la clonogénicité des

cellules tumorales de la prostate (D'Anjou *et al.*, 2011). Les cellules DU-145, une lignée cellulaire de CaP insensible aux androgènes et dérivée d'une métastase au cerveau (Stone *et al.*, 1978), dont l'expression de PACE4 est altérée par le ribozyme, ont un retard de croissance *in vitro* comparativement aux DU-145 de type sauvage. Lorsqu'implantée en xénogreffes sur des souris *nude* athymiques, cette lignée altérée présente un défaut pour la formation et le développement des tumeurs. De plus, elles forment près de 50 % moins de colonies en 10 jours que les DU-145 de type sauvage. La reprise de ces expériences avec une série de lignées cellulaires stables dont l'expression génique de chaque PC est réprimée individuellement avec des petits ARN en épingle à cheveux (shRNA), a permis de conclure que ces phénotypes sont uniques à PACE4 dans le CaP au sein de la famille des PCs (Couture *et al.*, 2012). *In vitro*, les essais de proliférations suggéraient que la répression de PACE4 ou PC7 permet de réduire le taux de croissance des DU-145 et des LNCap. Cependant, *in vivo*, seule la répression de PACE4 a entraîné une réduction de la croissance des xénogreffes supportant davantage l'importance fonctionnelle de PACE4 dans le CaP. Cette découverte a mené à la conception d'outils pharmacologiques et d'imagerie pour le traitement et le suivi du CaP, dont des inhibiteurs spécifiques à PACE4 (Kwiatkowska *et al.*, 2014a, 2014b, 2016, Levesque *et al.*, 2012, 2015) et un radiotraceur pour la détection de tumeurs par tomographie par émission de positrons (Couture *et al.*, 2014).

1.3.3.4 Nouvelle isoforme de PACE4 spécifique au cancer : PACE4-CtAlt

Au laboratoire, les travaux sur l'épissage alternatif de l'ARN messager de PACE4 ont permis de découvrir un site d'épissage alternatif de l'exon 25 non documenté dans la littérature (Couture *et al.*, manuscrit en préparation). En fait, cet événement d'épissage alternatif substitue le 3'UTR de l'ARNm en un 3'UTR beaucoup plus court. Fait intéressant, l'indice d'épissage (expression 3'UTR court/expression 3'UTR long) est élevé majoritairement dans les tissus où le taux d'épissage alternatif des protéines est élevé, dont entre autres, le foie, les testicules et le cerveau, mais également dans certains types de cancer, comme le CaP, le cancer du poumon, le cancer pancréatique et le cancer de la surrenale. En comparant des tissus sains et des tumeurs de CaP, l'expression du transcrit court est exclusive à la tumeur. Par conséquent, l'indice d'épissage a un grand pouvoir discriminatoire pour les tumeurs du CaP. Un fait d'autant plus intéressant est que ce transcrit alternatif mène à une toute nouvelle isoforme de PACE4 (PACE4-CtAlt) dont les 31 derniers résidus de la séquence consensuelle

sont changés par 29 résidus complètement différents. Ainsi, cette isoforme de PACE4 pourrait également représenter un biomarqueur potentiel pour le CaP, toujours inexploré à ce jour.

PROBLÉMATIQUE, HYPOTHÈSE DE TRAVAIL ET OBJECTIFS

2.1 Problématique et hypothèse

Chez la majorité des hommes qui sont atteints d'un CaP, la tumeur est indolente et a peu d'effet sur la qualité de vie et la survie de ces patients. En contrepartie, certains hommes subiront des conséquences graves de cette maladie, développeront des métastases et environs 1 homme sur 27 en mourra. Un outil de dépistage permettant de sélectionner et traiter le plus rapidement possible tous les patients qui pourraient développer des métastases et mourir de ce cancer et ignorer les cas indolents serait un atout pour la clinique. L'APS combiné au toucher rectal est le seul outil de dépistage utilisé en clinique en ce moment, mais il y a des limites et des inconvénients à son utilisation.

PACE4 a une fonction unique au sein de la famille des PCs et fondamentale pour la tumorigénèse et la croissance tumorale du CaP. Cette protéine est surexprimée dans les tumeurs de la prostate, corrélant avec le score de Gleason pathologique et le stade clinique. De plus, l'isoforme PACE4-CtAlt, découverte au laboratoire, est exclusivement exprimée par les tumeurs du CaP. Par conséquent, l'ensemble des évidences permet de poser l'hypothèse que l'isoforme consensuelle de PACE4 (PACE4-CtCons), ainsi que PACE4-CtAlt pourraient représenter des biomarqueurs utiles du CaP. Par contre, aucun essai biochimique ne permet à ce jour de doser précisément la concentration protéique de ces deux candidats potentiels dans des prélèvements biologiques comme le sang ou l'urine pour faire la démonstration de leur utilité clinique. Il est ainsi important de mettre au point un essai simple, robuste et sensible permettant de répondre à ce besoin.

2.2 Objectifs

2.2.1 *Objectif #1 Développer un essai de dosage de PACE4-CtCons et PACE4-CtAlt dans le plasma*

Pour ce faire, la MS offre une plateforme technologique idéale. Par conséquent, la mise au point d'un essai basé sur une méthode MRM pour le dosage des deux isoformes a été entreprise. Dans ce sens, la méthode MRM classique a été adaptée pour faciliter la mise au

point des paramètres de l'essai. Pour cette méthode pseudo-MRM, le MS est utilisé en mode balayage d'ions produits, c'est-à-dire qu'en Q1, il y a une sélection des m/z provenant des ions d'intérêts introduits dans l'analyseur et tous les ions produits sont analysés en Q3 et détectés au niveau du détecteur. L'extraction des ions fils ayant le m/z d'intérêt est faite bio-informatiquement avec l'aide de logiciels comme Skyline (MacLean *et al.*, 2010).

C'est dans le plasma que se sont priorisés les premiers essais puisque PACE4-CtCons a été détecté dans ces échantillons. Pour répondre à l'objectif, le plus grand défi fut le type d'échantillon biologique utilisé. Le plasma est une source considérable de biomarqueurs potentiels, mais la plage dynamique est immense entre les protéines les plus abondantes, comme l'albumine (35-50 g/L) et les biomarqueurs intéressants comme l'APS à une concentration moyenne de 1,1 $\mu\text{g/L}$ (ordre de magnitude de 10^7). (Anderson, 2002). Alors, l'analyse directement en pseudoMRM d'un plasma sans prétraitement entraîne beaucoup d'interférence et de compétition pour l'ionisation des peptides (Kitteringham *et al.*, 2009). Il faut ainsi adopter des stratégies de décomplexification des échantillons pour faciliter l'analyse en pseudoMRM.

Une première stratégie qui a été explorée est la déplétion des protéines abondantes dans le plasma avec l'aide d'une colonne *Multiple Affinity Removal System-14* (MARS-14). Cette colonne d'affinité permet de retirer des échantillons, 14 protéines très abondantes dans le plasma (albumine, immunoglobuline G, antitrypsine, immunoglobuline A, transferrine, haptoglobine, fibrinogène, alpha2-macroglobuline, alpha1-glycoprotéine acide, immunoglobuline M, apolipoprotéine AI, apolipoprotéine AII, complément C3 et transthyréline) avec l'aide d'anticorps monoclonaux couplés à la résine. Le retrait de ces protéines permettrait donc de réduire l'interférence sur les transitions d'intérêt, pour ainsi faciliter leur détection dans le plasma.

Une seconde stratégie qui a été mise au point en parallèle est le couplage d'une immunoprécipitation (IP) à une analyse pseudoMRM (IP-pseudoMRM) permettant de concentrer les analytes préalablement à leur analyse pseudoMRM, tout en éliminant plusieurs protéines interférentes. Pour ce faire, des anticorps spécifiques à chaque isoforme sont

nécessaires afin de pouvoir les discriminer. D'un autre côté, un anticorps permettant d'immunoprécipiter les deux isoformes pourrait également être utile si des peptides sensibles en pseudoMRM sont présents en C-terminale des isoformes, ce domaine étant le seul qui est variable entre les deux isoformes. Dans d'autres études, la combinaison d'une IP suivie d'une méthode MRM a permis de doser certains biomarqueurs dans le plasma avec une sensibilité et une spécificité comparable à l'ELISA quand la méthode était optimale (Lin et al., 2013). Ainsi, c'est une avenue très intéressante pour le projet.

2.2.2 Objectif #2 Comparer les niveaux de PACE4-CtCons et PACE4-CtAlt dans le sang de patients atteints d'un CaP et des patients sains

Au laboratoire, il y a une biobanque contenant plus de 1400 échantillons sanguins provenant de patients sains et de patients atteints d'un CaP, à différents degrés d'agressivité (score de Gleason 6 à 9) et à différents stades pathologiques. Des données cliniques comme l'âge, le stade pathologique, le score de Gleason ou le niveau d'APS sont associées à chaque échantillon. Avec la méthode mise au point, il sera possible de comparer les niveaux de PACE4-CtCons et PACE4-CtAlt dans les prélèvements sanguins entre les patients atteints d'un CaP et les patients sains, ainsi que de faire des associations entre les niveaux dosés et les différents paramètres cliniques pertinents dans le CaP. La biobanque est ainsi un outil indispensable au projet.

2.2.3 Objectif #3 Comparer les niveaux des deux isoformes de PACE4 dans l'urine

L'urine est également un prélèvement couramment utilisé en clinique qui est facile d'accès et sécuritaire. L'urine est majoritairement constituée d'eau et de quelques déchets métaboliques comme l'urée, la créatinine et des sulfates (Chen et Kim, 2016). La concentration protéique est plus faible dans l'urine comparativement au plasma, autour de 100 mg/L, et elle est très variable en fonction du temps de la journée et de la consommation d'eau. Le dosage de la créatinine permet cependant de compenser cette variabilité (Chen et Kim, 2016). D'un autre côté, l'urine demande moins de traitements avant son analyse en MS. Il serait ainsi intéressant de vérifier s'il est possible de doser les isoformes de PACE4 dans ce prélèvement biologique. En supposant que PACE4 soit sécrétée dans la lumière de la

glande prostatique par l'épithélium, il se pourrait qu'elles parviennent à l'urine. L'essai d'IP-pseudoMRM mis au point a été employé pour vérifier si PACE4-CtCons ou PACE4-CtAlt sont détectables dans les urines de ces patients, puisque des échantillons sont disponibles au laboratoire (plus de 400 urines de patients atteints d'un CaP dans la biobanque).

MATÉRIELS ET MÉTHODES

3.1 Échantillons cliniques et biobanque

Depuis 2010, des échantillons de prostate (tumeurs à la prostate et contrôles sains), de sang et d'urine sont collectés en clinique au Centre Hospitalier Universitaire de Sherbrooke (CHUS). Le consentement libre et éclairé de tous les patients opérés pour une prostatectomie radicale en raison d'un CaP est obtenu par un membre du laboratoire directement en clinique préparatoire à la chirurgie, au moment du rendez-vous pré-opératoire. Au moment de la chirurgie, de 50 à 100 mL d'urine et environs 20 mL de sang sont récoltés en salle d'opération immédiatement après l'anesthésie générale et avant le début de la chirurgie. Le sang et l'urine sont immédiatement transportés au laboratoire et centrifugés (1000 x g, 10 min) afin d'extraire le plasma du sang et de retirer les cellules et déchets insolubles dans l'urine. Les échantillons sont transférés dans des nouveaux tubes, numérotés et entreposés à -80 °C jusqu'à leur utilisation.

Un second protocole clinique (#12-151) a été accepté par le comité d'éthique du CHUS en 2013. Le consentement libre et éclairé de tous les hommes se présentant au CHUS pour un test d'APS, atteint ou non d'un CaP, est obtenu par les techniciennes et techniciens au centre de prélèvement du CHUS. Une fois les analyses biochimiques prescrites complétées, le sérum non utilisé est conservé à 4 °C dans les laboratoires de biochimie clinique du CHUS jusqu'à la collecte quotidienne des échantillons par un membre du laboratoire. Les sérums sont par la suite transférés dans des nouveaux tubes, numérotés et entreposés à -80 °C jusqu'à leur utilisation. Les patients peuvent aussi consentir à donner un échantillon d'urine. L'urine obtenue est traitée et entreposée comme préalablement décrit.

3.2 Synthèse peptidique

Les peptides ont été synthétisés manuellement par synthèse peptidique en phase solide sur une résine de polystyrène TentaGel SRAM d'une capacité de 0,23 mmol g⁻¹ (Polymère Rapp, Tübingen, Allemagne) comme décrit précédemment (Kwiatkowska et al., 2014). En bref, le couplage séquentiel des acides aminés dont les extrémités N-terminales sont protégées d'un groupement carbonochloridate de 9H-fluorén-9-ylméthyle (Fmoc) et dont les chaînes latérales sont protégées avec des groupements chimiques compatibles avec cette stratégie de

synthèse, a été effectué dans une solution de dichlorométhane (CH_2Cl_2)/N,N-diméthylformamide (DMF) (1 : 1 v/v) avec 3 équivalents d'hexafluorophosphate de (diméthylamino)-N,N-diméthyl(3H-[1,2,3]triazolo[4,5-b]pyridin-3-yloxy) méthaniminium (HATU) ou d'hexafluorophosphate de (1H-benzotriazol-1-yloxy)(tri-1-pyrrolidinyl)phosphonium (PyBOP) et 3 équivalents 6-chloro-1H-benzotriazol-1-ol (6-Cl-HOBt) ainsi que 9 équivalents de N-éthyl-N-isopropyl-2-propanamine (DIPEA). Le retrait des groupements Fmoc a été réalisé par le traitement de la résine avec une solution de 20 % pipéridine/DMF pendant 15 min (2 x). Une fois la synthèse achevée, la résine couplée aux peptides a été traitée avec une solution d'acide trifluoroacétique (TFA)/eau/triisopropylsilane (TIS) (95 : 2,5 : 2,5 v/v/v) et agitée pendant 3 h pour décrocher les peptides. La solution de peptides a été filtrée et concentrée sur un évaporateur sous vide. Les peptides ont ensuite été précipités dans de l'éther diéthylique (Et_2O) froid, centrifugés (10 min, 5000 rpm, température pièce) et lavés avec de l' Et_2O . Suite à une centrifugation (10 min, 5000 rpm, température pièce), le surnageant a été retiré et les peptides ont été dissous dans l'eau (parfois avec un petit volume de *tert*-butanol pour faciliter la solubilisation) et lyophilisés pour obtenir les composés bruts.

Les composés bruts ont été purifiés et analysés sur un système de chromatographie liquide haute performance (HPLC) de la série 1100 de la compagnie Agilent Technologies (Agilent Technologies, Palo Alto, CA, É.-U.), équipé d'un détecteur UV VARIAN ProStar et d'un détecteur à barrettes de diodes. Les solutions utilisées pour la phase mobile sont de l'eau/0,1 % TFA (solvant A) et de l'acétonitrile (ACN)/0,1 % TFA (solvant B). Une colonne semi-préparative C18 Zorbax Eclipse XDB de 9,4 mm x 250 mm (Agilent Technologies, Palo Alto, CA, É.-U.) a servi pour la purification des peptides. L'identité des peptides a été confirmée par MALDI-TOF (Bio-Rad Laboratories, Hercules, CA, É.-U.) et les fractions contenant les peptides ont été rassemblées et lyophilisées. La pureté des peptides a été vérifiée sur une colonne C18 Phenomenex Jupiter de 4,6 mm x 250 mm (Phenomenex, Torrance, CA, É.-U.) ou une colonne C18 Agilent Elipse XDB de 4,6 mm x 250 mm (Agilent Technologies, Waldbronn, Allemagne).

3.3 Vecteurs d'expression

Des vecteurs d'expression ont été produits par le service de synthèse génique *GeneArt* (Thermo Scientific, Hudson, NH, É.-U.) pour exprimer les deux isoformes de PACE4 dans les cellules. Brièvement, les séquences traduites, humaines, de PACE4-CtCons et PACE4-CtAlt ont été insérées dans un vecteur pcDNA3,1. Ce vecteur d'expression permet d'ajouter une étiquette V5 (GKPIPNPLLGLDST) en C-terminale de la protéine ainsi qu'une étiquette 6-histidines (HHHHHH) (Figure 6).

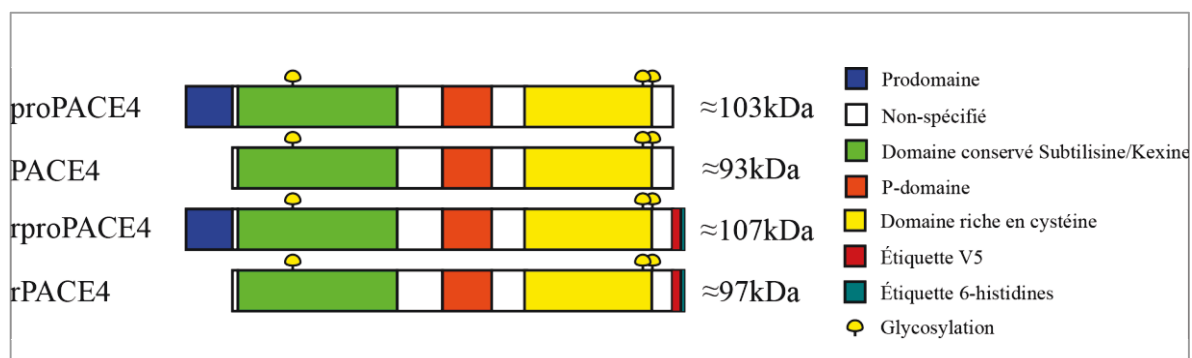


Figure 6. Organisation des domaines structuraux de PACE4 et poids moléculaire

La forme recombinante comprend une étiquette V5 pour la détection de PACE4 et un domaine polyhistidine pour la purification. Trois sites de glycosylation sont répertoriés dans UniProt aux positions indiquées dans le schéma. Le poids moléculaire est estimé en incluant les glycosylations, qui ajoutent environ 1 kDa par site de glycosylation ($\approx +3$ kDa). Le changement de séquence pour la forme alternative de PACE4 ne change pas le poids moléculaire. Ainsi, pour simplifier la figure, elle n'est pas représentée. r = recombinante

3.4 Culture cellulaire et transfection

Les cellules HEK293FT ont été maintenues à confluence dans du milieu DMEM (Wisent Inc., St-Bruno, Qc, Canada) supplémenté avec 10 % (v/v) de sérum fœtal bovin (FBS, Wisent Inc., Saint-Bruno Qc, Canada). Les cellules,ensemencées dans des pétris de 100 mm ($1,5 \times 10^6$ cellules/pétri), ont été transfectées à la Lipofectamine 2000 (Invitrogen, Carlsbad, CA, É.-U.), 24 h post-ensemencement, en suivant les recommandations du manufacturier. Préalablement à la transfection, le milieu a été changé pour du milieu Opti-MEM (GIBCO, Grand Island, NY, É.-U.). 15 μ g de vecteur (pcDNA3,1-hPACE4-CtCons et pcDNA3,1-hPACE4-CtAlt) ont été combinés aux liposomes et par la suite transférés au pétri, goutte à goutte. Le milieu a été changé pour un milieu frais DMEM/10 % FBS 8 h post-transfection

et 48 h post-transfection, le milieu a été transféré dans un tube et les cellules ont été lavées au PBS pour par la suite être récoltées avec l'aide d'un grattoir à cellules. Les cellules et le milieu ont été congelés à -80 °C, séparément, jusqu'à leur utilisation.

3.5 Marquage isotopique

Pour le marquage isotopique de PACE4, les cellules ont été conditionnées 24 h dans du RPMI pour SILAC (*Stable isotope labeling by amino acids in cell culture*, Thermo Scientific, Hudson, NH, É.-U.) sans arginine et lysine et supplémenté avec 10 % FBS dialysé (Thermo Scientific, Hudson, NH, É.-U.). L'arginine ($^{13}\text{C}6$, Cambridge Isotope Laboratories, Andover, MA, É.-U.) et la lysine ($^{13}\text{C}6$, Cambridge Isotope Laboratories, Andover, MA, É.-U.) ont été ajoutées de façon exogène à des concentrations de 42 $\mu\text{g/mL}$ et 73 $\mu\text{g/mL}$, respectivement. Les cellules ont ensuite été transfectées avec les vecteurs d'expression de hPACE4-CtCons et hPACE4-CtAlt comme préalablement décrit, à l'exception que le changement de milieu avant la transfection a été fait avec du milieu RPMI pour SILAC et le milieu a été changé pour un milieu complet SILAC 8 h post-transfection. L'incubation avant la récolte des cellules et du milieu a été de 48 h.

3.6 Purification

La purification de PACE4 isotopiquement marquée a été faite en condition dénaturante sur une résine de nickel ProBond (Life Technologies, Gaithersburg, MD, É.-U.). Les cellules ont été lysées dans un tampon dénaturant (100 mM HEPES/8 M urée/250 mM NaCl) à pH 7,8 avec six traitements de sonication de 10 secondes à 3 W sur glace avec des temps de repos de 10 secondes entre les traitements. Les lysats ont ensuite été centrifugés (17 000 x g, 15 min, température pièce) et les surnageants ont été transférés sur la résine de nickel. La résine de nickel (4 mL du mélange 50 % dans le tampon d'entreposage) a préalablement été lavée avec de l'eau désionisée et conditionnée avec le tampon dénaturant à pH 7,8. Les échantillons ont été incubés pour 1 h à température pièce sur un rotateur à tubes. La résine a été ensuite lavée avec 6 mL (3 x) de tampon dénaturant à pH 7,8 et 6 mL (3 x) de tampon dénaturant à pH 6. L'élution (3 x 2 mL) des protéines a été faite à pH 5 avec le tampon dénaturant et des fractions de 5 gouttes ($\approx 250 \mu\text{L}$) ont été récoltées. Les fractions contenant la PACE4 ont été identifiées par immunobuvardage en point et les fractions positives ont été analysées par TCE sur gel de polyacrylamide. Les fractions les plus pures ont été mises en

commun et l'urée a été éliminée dans les fractions sur un filtre centrifuge Amicon ayant une limite de poids moléculaire de 30 000 Da (Amicon 30K, EMD Millipore, Billerica, MA, É.-U.). Les échantillons ont finalement été réanalysés par TCE sur gel de polyacrylamide et par immunobuvardage western. La pureté de PACE4 suite à la purification a été déterminée sur les gels de polyacrylamide. Avec le logiciel Image J, le bruit de fond a été soustrait avec un rayon de bille roulante de 50 pixels et la densité de pixel brut a été mesurée pour la piste entière et pour la bande seule. Le calcul de la pureté est fait avec l'équation :

$$\text{Pourcentage de pureté} = \frac{\text{Densité de pixel brut de la bande}}{\text{Densité de pixel brut de la piste}} \times 100$$

3.7 Dosage protéique

Le contenu protéique dans les échantillons a été déterminé par méthode colorimétrique BCA (*BiCinchoninic acid Assay*, Thermo Scientific, Rockford, IL, É.-U.) en suivant le protocole et les recommandations du fournisseur.

3.8 Immunobuvardage de type western

L'ajout de 0,5 % (v/v) 2,2,2 -trichloroéthanol (TCE) dans les gels avant la polymérisation des gels permet de visualiser les protéines sans coloration à l'aide d'un imageur moléculaire GelDOC XR (Bio-Rad Labs, Richmond, CA, É.-U.) suite à la migration des protéines (Ladner *et al.*, 2004). Les protéines dénaturées dans un tampon laemmli 4 x (40 % glycérol/8 % dodécylsulfate de sodium (SDS)/0,04 % (p/v) bleu de bromophénol/5 % β-mercaptoéthanol/240 mM Tris/HCl pH 6,8) ont été chauffées à 95 °C pour 5 min et déposées dans les puits d'un gel de polyacrylamide 8,5 % pour ainsi être séparées par électrophorèse. Les protéines ont ensuite été transférées sur une membrane de nitrocellulose (Hybond, GE Healthcare, Chalfont St. Giles, UK) et les membranes ont été bloquées dans 5 % (p/v) albumine bovine (BSA) diluée du tampon TBS-T (TBS/0, 1 % Tween 20). Les anticorps primaires ont été incubés dans la solution de blocage pendant la nuit à 4 °C. Les dilutions d'anticorps utilisés en immunobuvardage western dans ce mémoire sont présentées dans le Tableau 1. L'anticorps secondaire, couplé à l'IRDye800 (LI-COR Biosciences, Lincoln, NE), a quant à lui été incubé pendant 1 h à température pièce et à l'abri de la lumière à une dilution de 1/10 000. La détection des bandes a été faite sur un imageur infrarouge (Odyssey Imager, LI-COR Biosciences) et les gels ont été analysés avec le logiciel Image J.

Tableau 1. Anticorps utilisés en immunobuvardage de type western

Anticorps	Dilution	Espèce	Fournisseur	Référence
Anti-PACE4	1/4000	Lapin	AbCam	EPR8320
Anti-V5	1/10 000	Souris	Invitrogen	46-0705

3.9 Immunobuvardage en point

Un système d'immunobuvardage en point à 96 puits (GE Healthcare/Whatman, Waukesha, WI, É.-U.) a servi pour déposer 10 µL de fractions de purifications sur une membrane de nitrocellulose. Les puits ont été lavés avec 500 µL de tampon PBS et la membrane a été retirée du système. Les membranes ont ensuite été traitées exactement comme un immunobuvardage western. Ainsi, le protocole précédemment décrit a été employé.

3.10 Sélection des billes pour l'immunoprécipitation

Le milieu de culture (500 µL) des cellules HEK293FT surexprimant PACE4-CtCons a été incubé pour la nuit à 4 °C avec 20 µL de toutes les billes disponibles au laboratoire provenant de différentes compagnies et ayant différentes fonctionnalisations (Tableau 2). Les billes ont ensuite été lavées 3 x avec du PBS-T (PBS/0, 1 % Tween 20) et les protéines liées non spécifiquement sur les billes ont été éluées par l'ajout de 30 µL de tampon laemmli 4 x. Le tout a été analysé par immunobuvardage western avec l'anti-V5.

Tableau 2. Liste des billes testées pour la sélection

	Fournisseur	Fonctionnalisation	Type de billes	Référence
1	Santa Cruz Biotechnology (Santa Cruz, CA, É.-U.)	Protéine A	Agarose	sc-2001
2	EMD Millipore (Billerica, MA, É.-U.)	Protéine A	Magnétique	LSKMAGA02
3		N-hydroxysuccinimide (NHS)	Magnétique	LSKMAGN01
4	ReSyn Biosciences (Pretoria, Afrique du Sud)	Protéine A	Magnétique	MR-PRA002
5		Streptavidine	Magnétique	MR-STV002
6		Carboxyle	Magnétique	MR-CBX002
7	Ocean NanoTech (Springdale, AR, É.-U.)	Protéine A	Magnétique	HPA1001
8	Bioclone Inc (San Diego, CA, É.-U.)	Hydrazide	Magnétique	FD-103

3.11 Biotinylation des anticorps

La biotinylation des anticorps a été faite directement sur des billes magnétiques afin d'éliminer la présence du tampon d'entreposage des anticorps qui contient de l'azoture de sodium, un interférant à la réaction du succinimidyle (NHS). Ainsi, les anticorps ont été couplés sur des billes magnétiques fonctionnalisées à la protéine A (ReSyn Biosciences, Pretoria, Afrique du Sud) selon les spécifications du manufacturier pour 1 h à la température pièce. Après 3 lavages au PBS et 3 lavages au tampon de couplage (100 mM tampon phosphate, 150 mM NaCl, pH 7,5), un excès molaire (20 x) de biotine-NHS (ProteoChem, Loves Park, IL, É.-U.) diluée dans le tampon de couplage a été ajouté sur les anticorps. La réaction a été conduite à la température pièce pendant 1 h et la réaction fut neutralisée par l'ajout de Tris/HCl pH 7,5 à une concentration finale de 100 mM. Les billes ont ensuite été lavées 4x avec du PBS pour éliminer l'excès de biotine et 1 volume de 100 mM acide citrique pH 3 (2 x) a été ajouté pour éluer les anticorps à une concentration d'environ 1 µg/µL (5 min d'incubation, avec vortex). Enfin, le tampon a été neutralisé avec des petits volumes de 1 M HEPES et les anticorps biotinylés ont été dosés à l'aide de l'essai BCA. Ils ont été entreposés à -20 °C jusqu'à leur utilisation avec 0,01 % d'azoture de sodium et 50 % (v/v) de glycérol.

3.12 Immunoprécipitation

L'identification des peptides d'intérêt de PACE4 et la validation des anticorps ont été faites dans un volume final de 500 µL tandis que les IPs dans l'urine et le plasma ont été faites dans 1 mL d'échantillon. Pour la validation des anticorps, les cellules HEK293FT surexprimant hPACE4-CtCons ou hPACE4-CtAlt ont été lysées dans un tampon RIPA (50 mM Tris-HCl ; 150 mM NaCl ; 0,1 % (v/v) SDS ; 0,5 % (v/v) sodium déoxycholate ; 1 % (v/v) NP40) avec des inhibiteurs de protéases (Complete Mini, Roche, Indianapolis, IN, É.-U.) pour 30 min sur la glace. Les lysats ont ensuite été centrifugés (17 000 x g, 15 min) et des volumes décroissants (50 µL, 25 µL, 12,5 µL, 6,5 µL et 0 µL) de surnageant ont été ajoutés à du plasma de souris CD1 mâle (Innovative Research, Novi, MI, É.-U.). Pour les analyses dans l'urine, 10 mL d'urine ont été concentrés à environ 1 mg/mL sur un filtre centrifuge Amicon ayant une limite de poids moléculaire de 10 000 Da (Amicon 10K, EMD Millipore, Billerica, MA, É.-U.). Les plasmas ont été centrifugés (17 000 x g, 15 min) et transférés dans des nouveaux tubes avant leur emploi en IP. Un mélange d'inhibiteurs de protéases (Complete Mini, Roche, Indianapolis, IN, É.-U.) est toujours ajouté aux échantillons.

Les anticorps biotinylés (5-15 ug) et les billes fonctionnalisées à la streptavidine (3,3 $\mu\text{L}/\mu\text{g}$ d'anticorps, Ocean NanoTech, Springdale, AR, É.-U.) ont été ajoutés aux échantillons et incubés avec rotation pour la nuit à 4 °C et les billes ont été lavées 4 x au PBS-T. Quand la méthode d'analyse est l'immunobuvardage western, les protéines ont été éluées avec 200 mM glycine-HCl à pH 2,2 et diluées dans un tampon laemmli. Pour les analyses en spectrométrie de masse suivant l'IP, les billes ont été conditionnées 3 x avec 50 mM de bicarbonate d'ammonium (NH_4HCO_3) à pH 8. Les billes ont ensuite été incubées pour la nuit avec 0,2 μg de trypsine-LysC (Promega, Madison, WI, É.-U.) dans un volume suffisant pour couvrir les billes de 50 mM NH_4HCO_3 (\approx 50-100 μL). L'incubation a été faite à 37 °C pour la nuit sur un bloc chauffant rotatif. Le surnageant qui contient les peptides issus de la digestion a été transféré dans un nouveau tube et les billes ont été lavées avec un volume (\approx 100 μL) de 50 mM NH_4HCO_3 . Le lavage et le surnageant ont été combinés.

3.13 Préparation des échantillons pour l'analyse en spectrométrie de masse

Les peptides ont été réduits dans 5 mM de dithiothréitol (DTT) pour 1 h à température pièce et l'alkylation des cystéines a été conduite avec 10 mM d'iodoacétamide (IAA) pour 30 min, à température pièce dans le noir. La réaction a ensuite été neutralisée par l'ajout de 10 mM DTT (30 min, température pièce). Les échantillons ont par la suite été acidifiés à une concentration finale de 2 % (v/v) acide formique (AF) et dessalés par extraction en phase solide (SPE) sur une résine polymérique fonctionnalisée en phase inverse (Phenomenex, Torrance, CA, É.-U.). La colonne SPE a été activée avec de l'ACN et conditionnée avec 2 % AF. Ensuite, les peptides ont été ajoutés à la colonne et lavés avec 5 % ACN/2 % AF. L'élution des peptides a été faite avec 75 % ACN/2 % AF. Les échantillons ont finalement été séchés dans un évaporateur centrifuge et dissous dans 1 % AF.

3.14 Chromatographie liquide

Les peptides ont été séparés par chromatographie liquide sur un système MicroLC 200 (Eksigent, Dublin, CA, É.-U.) préalablement à leur introduction dans le MS. Les échantillons ont été chargés sur une colonne Halo Peptide ES-C18 (Advanced Materials Technology, Wilmington, DE), ayant une longueur de 15 cm, un diamètre de 300 μm et des particules de 2,7 μm , par surcharge de la boucle d'injection (5 μL) avec 7 μL d'échantillon et à l'aide d'un

échantillonneur automatisé PAL HTC-xt (CTC Analytics, Zwingen, Suisse). La phase mobile est composée de deux solvants, le solvant A étant de l'eau / 3 % diméthylsulfoxyde (DMSO) / 0,2 % AF et le solvant B étant de l'éthanol 100 % / 3 % DMSO / 0,2 % AF. Les peptides ont été élués de la colonne dans le MS à un flux de 3 μ L/min sur un gradient en 2 phases : une première pente plus douce débutant à 5 % de solvant B et augmentant de 1,33 % / min en solvant B sur 30 min et une seconde pente de 11 % / min jusqu'à 100 % de solvant B. Un plateau de 5 min à 100 % de solvant B suit les gradients pour finalement redescendre aux conditions initiales (5 % solvant B).

3.15 Spectrométrie de masse en tandem (MS/MS)

Une sonde ESI de 25 μ m a été utilisée pour introduire les peptides dans la source DuoSpray (Sciex, Concord, ON, Canada) d'un spectromètre de masse en tandem TripleTOF 5600 (Sciex, Concord, ON, Canada) muni d'un analyseur hybride quadripôle/temps de vol (Q-TOF). L'acquisition des spectres TOF MS (350-1250 Da, résolution >30 000 Da) et TOF MS/MS (100-1800 Da, résolution >15 000 Da) a été faite sur des périodes cycliques de 610 ms comprenant un TOF-MS avec un temps d'accumulation des spectres de 25 ms ainsi que 40 cycles TOF MS/MS de 35 ms d'accumulation des spectres. Les valeurs des paramètres pour le gaz nébuliseur, le gaz chauffant, le *curtain gaz*, la température et le voltage de la source ainsi que le potentiel de dissociation ont été fixés respectivement à 12, 10, 27, 225 °C, 5200 V et 110 V. L'énergie de collision pour l'acquisition des spectres TOF MS a été fixée à 10 et un balayage de l'énergie de collision (*rolling collision energy*) fixé à 5 a été appliqué pour l'acquisition des spectres TOF MS/MS.

3.16 Analyses en mode multiple reactions monitoring

Une méthode indépendante pour chaque transition a été mise au point par infusion des peptides synthétiques dans le MS. L'énergie de collision et le potentiel de dissociation ont été variés jusqu'à l'obtention d'un signal optimal. Les valeurs fixées sont présentées dans le Tableau 3. Pour les méthodes pseudoMRM, l'acquisition des spectres TOF MS (100-1250 Da, résolution >30 000 Da) et TOF MS/MS (100-1250 Da, résolution >15 000 Da) a été faite sur des périodes cycliques de 610 ms avec un temps d'accumulation des spectres de 35 ms. Les valeurs des paramètres pour le gaz nébuliseur, le gaz chauffant, le *curtain gaz*, la température et le voltage de la source ont été fixées respectivement à 12, 2, 27, 225 °C et

5100 V. L'énergie de collision pour l'acquisition des spectres TOF-MS a été fixé à 10. Des courbes standards (500 ng/mL à 3,9 ng/mL) avec les peptides synthétiques (MLELSAPELEPPK et NVVVTILDDGIER) dans 1 % AF ont également été faites.

Tableau 3. Paramètres du TripleTOF 5600 pour les transitions de PACE4

Peptide	MLELSAPELEPPK				AEGQWTLQDLPSQVR				NVVVTILDDGIER		LETFWVVTGR	
Léger/Lourd	Léger		Lourd		Léger		Lourd		Léger	Lourd	Léger	Lourd
Transitions (Précurseur / Produits)	727,4 / 809,44	727,4 / 967,51	730,4 / 815,46	730,4 / 973,53	657,3 / 586,33	985,5 / 586,33	659,3 / 592,35	988,51 / 592,35	721,9 / 817,41 & 1031,54	724,9 / 823,43 & 1037,56	654,85 / 818,45 & 632,37	657,8 / 824,47 & 638,39
Énergie de collision	30	30	30	30	25	25	25	25	30	30	34	34
Potentiel de dissociation	140	140	140	140	100	100	100	100	110	110	100	100

3.17 Multiple Affinity Removal System-14 (MARS 14)

Cinq plasmas (200 µL au total) ont été mis en commun, dilués 1/25 dans le tampon A et filtrés sur un filtre de 0,22 µm (EMD Millipore, Billerica, MA, É.-U.). L'échantillon a été déplété des protéines abondantes séquentiellement par fractions de 200 µL avec une colonne centrifuge MARS-14 (Agilent Technologies, Palo Alto, CA, É.-U.) dont la capacité maximale est de 8 µL de plasma par utilisation, en suivant le protocole du fabricant. La première étape est le conditionnement de la colonne qui a été fait à l'aide d'une seringue de 4 mL de tampon A. Le surplus de tampon a été retiré à la pipette et 200 µL d'échantillon ont été déposés sur la colonne qui a ensuite été centrifugée (100 x g, 1,5 min.). La colonne a par la suite été lavée 2 x avec 400 µL de tampon A et le lavage contenant les protéines de faibles abondances a été conservé. À l'aide d'une seringue, les protéines de haute abondance ciblées par la colonne ont été éluées par l'ajout de 2 mL de tampon B et conservées pour fin d'analyse. Enfin, la colonne a été rééquilibrée avec le tampon A et le cycle a été recommencé jusqu'à ce que l'échantillon au complet soit déplété (± 25 cycles). Les protéines de faible abondance contenues dans les lavages et les fractions d'élutions contenant les protéines abondantes ont été respectivement mis en commun. La totalité des protéines de faible abondance et 1 mL de protéines de haute abondance ont été réduits 1 h à température pièce avec 5 mM DTT et alkylés 30 min avec 10 mM IAA. La réaction a été neutralisée pour 30 min avec 10 mM DTT. Les protéines ont ensuite été précipitées par l'ajout

d'acétone/méthanol froid (8 :1 v/v) et incubées à -80 °C pour la nuit. Les culots ont ensuite été lavés 3 x au méthanol froid et séchés à l'évaporateur centrifuge sous vide. Les protéines ont été dissoutes dans 50 mM NH_4HCO_3 et digérées avec de la trypsine-LysC (1 μg trypsine-LysC/30 μg de protéines) (Promega, Madison, WI, É.-U.). Le mélange avec l'endoprotéinase LysC permet d'augmenter l'efficacité de la digestion trypsique en aidant à la digestion des protéines repliées de façon serrée (Saveliev *et al.*, 2013). Les peptides ont ensuite été dissous dans un volume final de 1 mL 2 % AF, dessalés par SPE en phase inverse, séchés sur un évaporateur centrifuge et dissous dans 1 % AF. Les échantillons ont été analysés par pseudoMRM.

3.18 Sage Electrophoretic Lateral Fractionator (ELF)

Les protéines urinaires ont été fractionnées sur un appareil Sage ELF (Sage Science, Inc., Beverly, MA, É.-U.). Le protocole et les recommandations du fabricant ont été suivis intégralement. Tout d'abord, les protéines urinaires (1 mg) ont été précipitées par l'ajout d'acétone/méthanol froid (8 :1 v/v) et incubées à -80 °C pour la nuit. Le culot a ensuite été lavé 3 x au méthanol froid et séché à l'évaporateur centrifuge sous vide. Le culot a été dissout dans 44 μL d'eau, 28 μL de tampon de chargement Sage (contient du SDS) et 8 μL de 1 M DTT (10 mM finale). L'échantillon a été chauffé à 85 °C pour 6 min, divisé en 2 et déposé dans les puits de chargement de 2 cassettes de migration contenant un gel d'agarose de 3 %. Les deux moitiés ont été migrées en parallèle dans l'appareil pour 1 h et éluées perpendiculairement dans les puits de collection pour 30 min (voir Figure 7). L'une des moitiés a été analysée par immunobuvardage western et l'autre par MS en mode pseudoMRM.

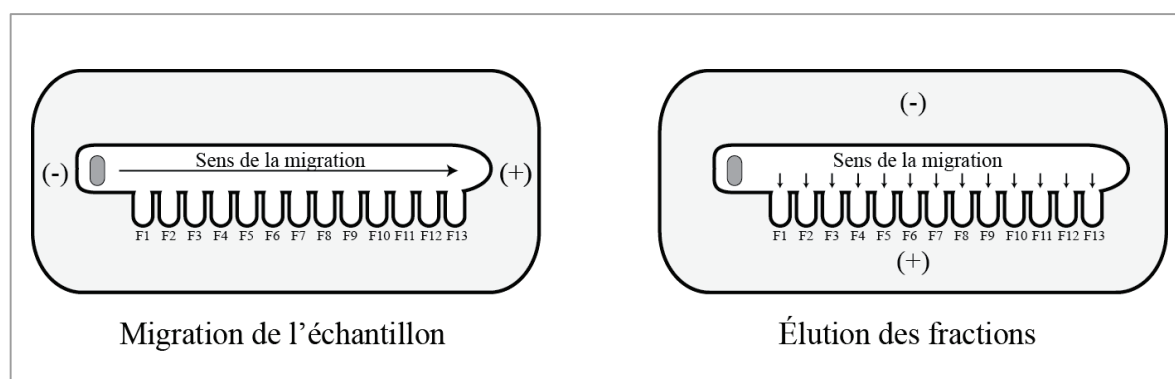


Figure 7. Principe du Sage ELF

Le fractionnement des protéines sur un système Sage ELF est fait en deux étapes. Tout d'abord, la migration des protéines dans le gel d'agarose est faite par électrophorèse et elle sépare les protéines en fonction du poids moléculaire. En second lieu, les protéines sont éluées perpendiculairement au sens de la migration vers les puits de collections par électrophorèse.

À la fin de la migration, les fractions d'élution (30 μ L) ont été transférées dans des tubes de 1,5 mL. Pour l'immunobuvardage western, du tampon laemmli a été ajouté aux échantillons et les échantillons ont été entreposés à -30 °C jusqu'à leur analyse. Pour l'analyse pseudoMRM, un lavage des puits a été effectué avec 30 μ L d'eau et les lavages ont été mis en commun avec les fractions d'élutions. Le pH des échantillons a été neutralisé avec 3 μ L de 1 M HEPES. Les protéines ont été réduites 1 h à température pièce avec 5 mM DTT et alkylées 30 min avec 10 mM IAA à l'abri de la lumière. La réaction a ensuite été neutralisée avec 10 mM DTT. Le SDS dans les échantillons a été dilué à 0,02 % par l'ajout de NH_4HCO_3 (dilution 1/5) et les protéines ont été digérées à la trypsine-LysC (1 μ g trypsine/30 μ g de protéines). La digestion a été arrêtée par l'ajout de 12 μ L d'acide formique 50 %. Le SDS a été éliminé des échantillons par précipitation au chlorure de potassium (KCl) comme préalablement décrit (Carraro *et al.*, 1994). Brièvement, 1 volume de 4 M KCl a été ajouté aux échantillons qui ont été brassés vigoureusement par la suite et incubés 10 min. Les molécules de dodécylsulfate de potassium (KDS) formées ont été retirées par deux extractions à l'acétate d'éthyle. L'excès d'acétate d'éthyle est éliminé dans un évaporateur centrifuge. Les peptides ont ensuite été traités pour leur analyse en MS/MS comme dans la section 3.13 Préparation des échantillons pour l'analyse en spectrométrie de masse

3.19 Digestion trypsique sur gel d'acrylamide

Le protocole suivi pour la digestion directe sur gel de polyacrylamide est tiré d'un article publié dans le journal Nature Protocole (Shevchenko *et al.*, 2007). Les protéines (180 μ g provenant d'urine concentrée sur Amicon 10K) ont été migrées dans un gel de polyacrylamide 6 % et les protéines ont été colorées au bleu de Coomassie pour 30 min. Le gel a ensuite été décoloré avec une solution d'eau/méthanol/acide acétique (45 : 45 : 10 v/v/v) et rincé 1 h dans l'eau. Une bande à \approx 90 kDa a été excisée et hachée en cubes de 1 mm³ à l'aide d'une lame tranchante. Les morceaux de gel ont ensuite été transférés dans un tube de 1,5 mL et couverts de 500 μ L d'une solution de NH_4HCO_3 /ACN (1 : 1 v/v) pour 30 min (avec vortex). Trois volumes d'ACN (1500 μ L) ont ensuite été ajoutés pour assécher les

cubes jusqu'à ce qu'ils aient une apparence blanchâtre. L'ACN a ensuite été retiré et les cubes ont été séchés à l'air. Un volume de trypsine-LysC (13 ng/μL) dans un tampon 10 mM NH₄HCO₃/10 % ACN suffisant pour couvrir les cubes a été ajouté dans le tube et l'échantillon a été incubé sur glace jusqu'à ce que tout le volume soit absorbé par les cubes. Les étapes ont été répétées jusqu'à ce que les cubes n'absorbent plus la solution de trypsine. Pour éviter que les cubes s'assèchent, ils ont été couverts de 30 μL de NH₄HCO₃ et l'échantillon a été incubé à 37 °C pour la nuit. Les peptides ont été extraits du gel en ajoutant une solution de 10 % (v/v) AF et le surnageant contenant les peptides a été transféré dans de nouveaux tubes. Les peptides ont ensuite été préparés pour leur analyse en MS/MS comme dans la section 3.13 Préparation des échantillons pour l'analyse en spectrométrie de masse.

3.20 Analyses bio-informatiques et statistiques

L'identification des protéines et des peptides a été faite avec le logiciel ProteinPilot (Sciex, version 4,5). Des paramètres prédéfinis de recherche ont été entrés dans le logiciel, soit pour l'instrument étant un TripleTOF 5600, l'alkylation des cystéines par IAA, la digestion à la trypsine et un accent de recherche sur l'identification de modifications biologiques. Le logiciel fait la digestion *in silico* d'une base de données maison combinant le protéome *Homo sapiens* issu d'UniProt (données extraites le 3 juillet 2013) en format FASTA, la séquence de PACE4 recombinante et un ensemble de contaminants communs, et aligne ceux-ci avec l'algorithme Paragon (version 4,5) aux spectres générés par l'analyse MS/MS. Le logiciel fait également l'analyse du taux de fausses découvertes (FDR : *false discovery rate*). La qualité des spectres TOF-MS et TOF-MS/MS a été vérifiée à l'aide du logiciel PeakView (Sciex, Version 1,2) et l'intégration de l'aire sous la courbe (AUC) des spectres pseudoMRM est faite avec le logiciel Skyline (MacLean *et al.*, 2010). Les analyses statistiques et les graphiques ont pour la plupart été faits avec le logiciel GraphPad Prism6. Pour chaque analyse, le test statistique employé est inscrit dans la description de la figure. Le test de normalité Shapiro-Wilk ainsi que les histogrammes de normalité ont été faits à l'aide du logiciel R (Version 3,3, 0) et le progiciel *ggplot2*. Enfin, la matrice de corrélation a été faite avec le progiciel *corrplot* dans R.

RÉSULTATS

4.1 Optimisation de l'essai pseudoMRM pour détecter PACE4 dans le plasma humain

4.1.1 Identification, sélection et optimisation des peptides monitorés

La première étape dans la mise au point d'un essai pseudoMRM est la sélection des peptides d'intérêts. Pour ce faire, la PACE4-CtCons produite de façon recombinante (Figure 6) a été immunoprécipitée avec trois anticorps (anti-V5, anti-domaine P et anti-CtCons) et les échantillons ont été analysés par MS/MS.

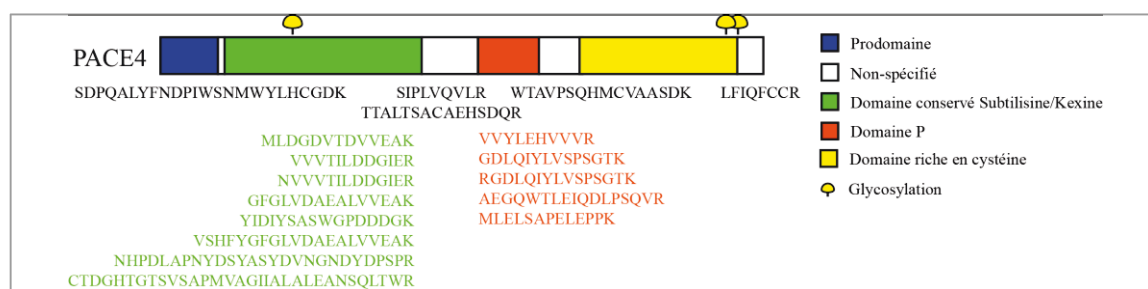


Figure 8. Localisation des peptides de PACE4 identifiés

Les peptides identifiés par ProteinPilot sont représentés vis-à-vis les domaines correspondant à leur localisation sur la séquence protéique de PACE4. La couleur des peptides indique le domaine associé au peptide (vert = domaine subtilisine/kexine (catalytique), orange = domaine P, jaune = domaine riche en cystéines, noir = séquences non spécifiés). Pour des fins de simplification, seule la séquence consensuelle de PACE4 est représentée.

Les protéines et les peptides ont été identifiés à l'aide du logiciel ProteinPilot et, en tout, 20 peptides potentiels de PACE4 ont été mis en évidence (Tableau 4). La localisation des peptides identifiés est représentée à la Figure 8.

Tableau 4. Peptides de PACE4 et de l'APS identifiés par ProteinPilot.

	Conf. (%)	Séquence d'AA	N AA	Mutations/Modifications/ Clivages	Ion parent (m/z)	Charge (z)	N obs.
Protéine: PACE4							
1	99,00	AEGQWTLEIQDLPSQVR	17		985.50	2	3
2	99,00	CTDGHTGTSVSAPMVAGILALEANSQLTWR	32	Cys->Asp@1	1094.88	3	1
3	31,59	GDLQIYLVSPSGTK	14		739.40	2	3
4	99,00	GFGLVDAEALVVEAK	15	Clivage Y-G@N-term	759.41	2	1
5	99,00	GPFEKGKIPNPLLGLDSTR	19	***Étiquette V5***	670.03	3	1
6	41,02	LFQFCCR	8	Carbamidomethyl(C)@6; Carbamidomethyl(C)@7	572.29	2	1
7	99,00	MLDGDVTDVVEAK	13		696.34	2	1
8	99,00	MLELSAPELEPPK	13		727.38	2	3
9	99,00	MLELSAPELEPPK	13	Oxidation(M)@1	735.38	2	1
10	99,00	NHPDLAPNYDSYASYDVNGNDYDPSPR	27		1019.45	3	2
11	99,00	NVVVTILDDGIER	13		721.89	2	2
12	99,00	RGDLQIYLVSPSGTK	15	Clivage raté R-G@1	817.44	2	1
13	99,00	SDPQALYFNDPIWSNMWYLHCGDK	24	Carbamidomethyl(C)@21	986.44	3	1
14	98,88	SIPLVQVLR	9		512.83	2	1
15	99,00	TTALTSACAEHSDQR	15	Carbamidomethyl(C)@8	824.38	2	1
16	99,00	VSHFYGFGLVDAEALVVEAK	20		717.71	3	1
17	99,00	VVVVTILDDGIER	12	Clivage N-Y@N-term	664.87	2	1
18	99,00	VVYLEHVVR	10		404.91	3	2
19	99,00	WTAVPSQHMCVAASDK	16	Carbamidomethyl(C)@10	894.41	2	2
20	99,00	YIDIYSASWGPDDDGK	16	Clivage N-Y@N-term	901.40	2	2
Protéine: APS							
1	99,00	AVCGGVLVHPQWVLTAHCIR	21	Carbamidomethyl(C)@3; Carbamidomethyl(C)@19	586.88	4	N/A
2	99,00	FLRPGDDSSHDLMLLR	16		468.75	4	N/A
3	99,00	HSLFHPEDTGQVFQVSHSFPHPLYDMSLLK	30		699.63	5	N/A
4	99,00	HSQPWQVLVASR	12		704.39	2	N/A
5	99,00	IVGGWECEK	9	Carbamidomethyl(C)@7	539.26	2	N/A
6	99,00	KLQCVDLHVISNDVCAQVHPQK	22	Carbamidomethyl(C)@4; Carbamidomethyl(C)@15 Clivage manqué K-L@1	647.84	4	N/A
7	99,00	LQCVDLHVISNDVCAQVHPQK	21	Carbamidomethyl(C)@3; Carbamidomethyl(C)@14	615.82	4	N/A
8	99,00	LSEPAELTDAVK	12		636.85	2	N/A
9	99,00	NRFLRPGDDSSHDLMLLR	18	Oxidation(M)@15 Clivage manqué R-F@2	540.28	4	N/A
10	99,00	VMDLPTQEPALGTTCYASGWGSIEPEEFLTPKK	33	Carbamidomethyl(C)@15 Clivage manqué K-K@32	1218.39	3	N/A

Les peptides surlignés en gris sont ceux dont les caractéristiques physico-chimiques respectent les critères de sélection pour un peptide intéressant en MRM. Conf. = Niveau de confiance de l'identification, calculé par le logiciel Protein Pilot ; N AA = nombre d'acides aminés ; m/z = ratio masse-charge ; N obs. = Nombre d'IP ayant observé ce peptide (max. de 3.)

La sélection des peptides d'intérêt pour l'essai en pseudoMRM a été basée sur les caractéristiques physico-chimiques en suivant quelques critères bien précis (Picotti et Aebersold, 2012). Les peptides devaient être uniques, avoir moins de 20 résidus, avoir une charge idéalement de +2, avoir aucune modification post-traductionnelle ou expérimentale et posséder un ratio m/z stable. Les spectres ont par la suite été vérifiés manuellement pour en assurer la qualité. Le contrôle de qualité a réduit le nombre de peptides valides pour l'essai à trois, MLELSAPELEPPK, NVVVTILDDGIER et AEGQWTLEIQDLPSQVR. Ils ont été synthétisés et les paramètres du MS ont été optimisés pour chaque transition sélectionnée par

infusion des peptides dans le but d'obtenir la meilleure sensibilité (Figure 9). Deux transitions ont été optimisées par peptide pour avoir un niveau satisfaisant de confiance dans la détection des peptides. Le peptide AEGQWTLEIQDLPSQVR a été abandonné dans la suite des analyses, car il était très peu sensible comparativement aux deux autres peptides. Au cours de la maîtrise, un peptide unique à PACE4-CtAlt, LETFWVVTGR, a aussi été optimisé et ajouté à l'essai.

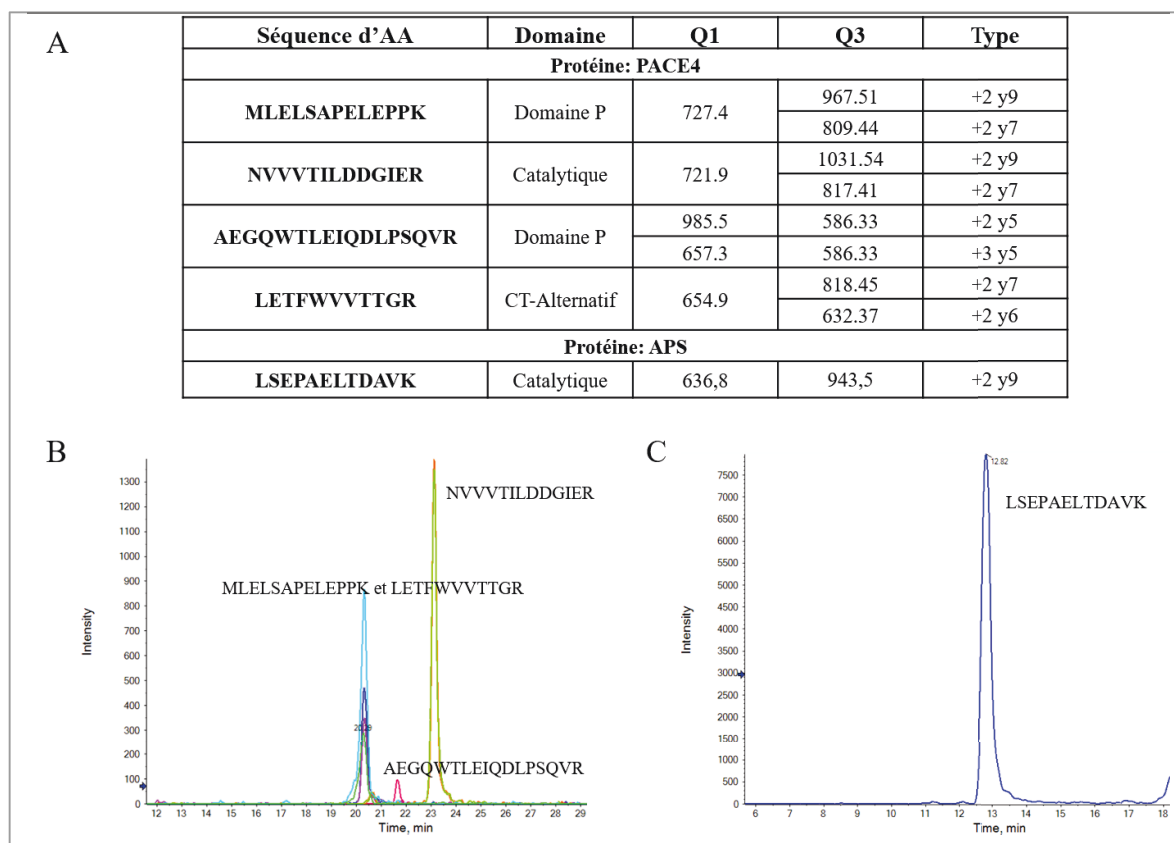


Figure 9. Transitions sélectionnées pour le suivi de PACE4 et de l'APS en pseudoMRM

A) Le tableau présente les m/z des ions parents (Q1) et des ions fils (Q3) pour les transitions sélectionnées de PACE4 et de l'APS. La charge et le type d'ion sont également listés. Une méthode pseudoMRM a été mise au point pour 3 peptides communs aux deux isoformes de PACE4 : MLELSAPELEPPK, NVVVTILDDGIER et AEGQWTLEIQDLPSQVR, ainsi qu'un peptide spécifique au CT-alternatif : LETFWVVTGR. Un seul peptide de l'APS (LSEPAELTDAVK) a été mis au point sur une possibilité de deux. **B)** Les chromatogrammes d'ions extraits montrent les temps de rétentions relatifs entre les peptides de PACE4 et **C)** le peptide de l'APS.

L'exercice a été répété avec de l'APS recombinante, dans le but d'identifier des transitions pour l'APS qui pourront éventuellement être intégrées à la méthode comme outils de validation de l'essai en comparant avec les dosages faits en clinique. La digestion trypsique de 1 µg d'APS recombinant purifié a permis d'identifier 10 peptides (Tableau 4). Les mêmes critères ont permis de sélectionner 2 peptides, dont 1 a été synthétisé, LSEPAELTDAVK, et dont les transitions ont été mises au point (Figure 9).

4.1.1.1 Courbes standards des peptides de PACE4

Les peptides synthétiques ont ensuite été dilués en série pour connaître la plage linéaire et les limites de détections de la méthode (Figure 10). Pour le peptide NVVVTILDDGIER, les deux transitions sont linéaires sur l'entièreté de l'étendue testée. La limite de détection n'a pas été atteinte avec ce peptide puisque le signal était encore très défini et d'une bonne intensité à 3,9 µg/L de peptide, qui est la concentration la plus faible testée. Pour ce qui est du peptide MLELSAPELEPPK, les courbes standards ont une allure plutôt quadratique. La limite de détection de la transition 727,4/809,4 n'a également pas été atteinte, mais celle de la transition 727,4/967,5 est estimée à 7,8 µg/L. Ainsi, avec le peptide NVVVTILDDGIER et la transition 727,4/809,4, l'essai pseudoMRM permet de détecter PACE4 à des concentrations aussi faibles que 2,7 nM tandis qu'avec la transition 727,4/967,5, PACE4 est détectable à 5,3 nM.

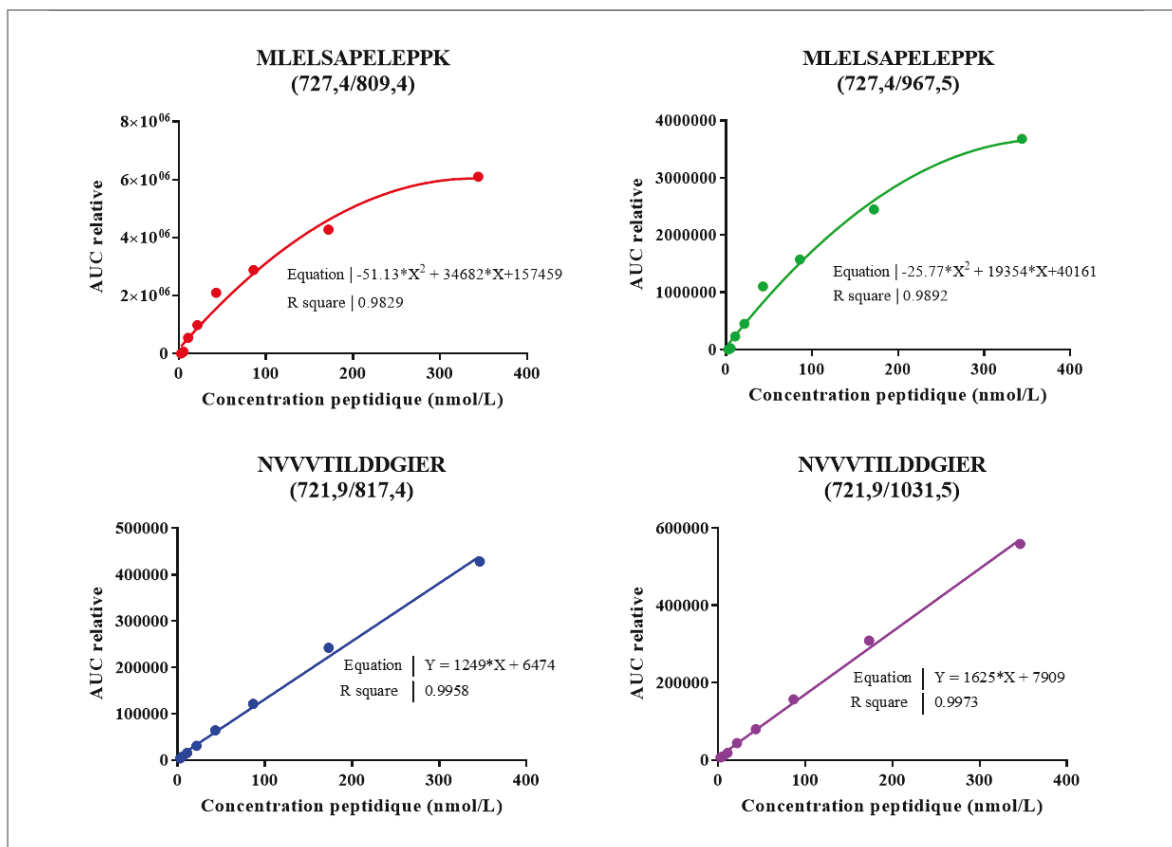


Figure 10. Courbes standards de peptides

Une courbe standard a été générée par pseudoMRM en diluant en série (1/2) une solution mère contenant les peptides MLELSAPELEPPK et NVVVTILDDGIER dans 1 % AF à une concentration de 500 µg/L (343,9 nM et 346,6 nM respectivement). La dilution des peptides a été faite jusqu'à 3,9 µg/L (2,7 nM) de chaque peptide.

4.1.2 Déplétion des protéines abondantes du plasma humain

Un essai pseudoMRM sensible alors optimisé, les premiers tests ont été conduits directement dans le plasma dont les niveaux de plusieurs protéines abondantes ont été réduits à l'aide d'un système d'immunodéplétion MARS14. En effet, 5 plasmas humains de patients atteints d'un CaP de stade avancé ont été mis en communs pour des fins de détection. L'échantillon, dilué dans le tampon de couplage (Tampon A), a été déplétée des protéines abondantes séquentiellement en fractions de 200 µL sur une colonne centrifuge MARS14 (Figure 11). Les fractions liant la colonne (protéines abondantes) ont également été analysées pour s'assurer que PACE4 ne soit pas éliminée du plasma par des interactions protéine-protéine avec ces protéines de haute abondance. Plusieurs pics sont observables sur les chromatogrammes d'ions extraits de chaque transition, mais seule la transition 727,4/967,5

semble avoir un faible signal au même temps de rétention que son peptide associé dans 1 % AF, qui pourrait correspondre à l'ion de ce peptide. Par contre, cette transition n'étant pas la plus sensible pour peptide MLELSAPELEPPK, la transition 727,4/809,4 aurait dû également être détectée dans l'échantillon, ce qui n'est pas le cas. Alors, ce signal observé est probablement un pic contaminant. En somme, en procédant par immunodéplétion sur une colonne MARS14, l'essai ne semble pas assez sensible pour détecter avec confiance (2 peptides/ 2 transitions par peptide) PACE4 directement dans le plasma humain. En considérant les limites de détection de l'essai pseudoMRM, le développement d'un essai d'enrichissement de PACE4 dans les échantillons serait plus juste.

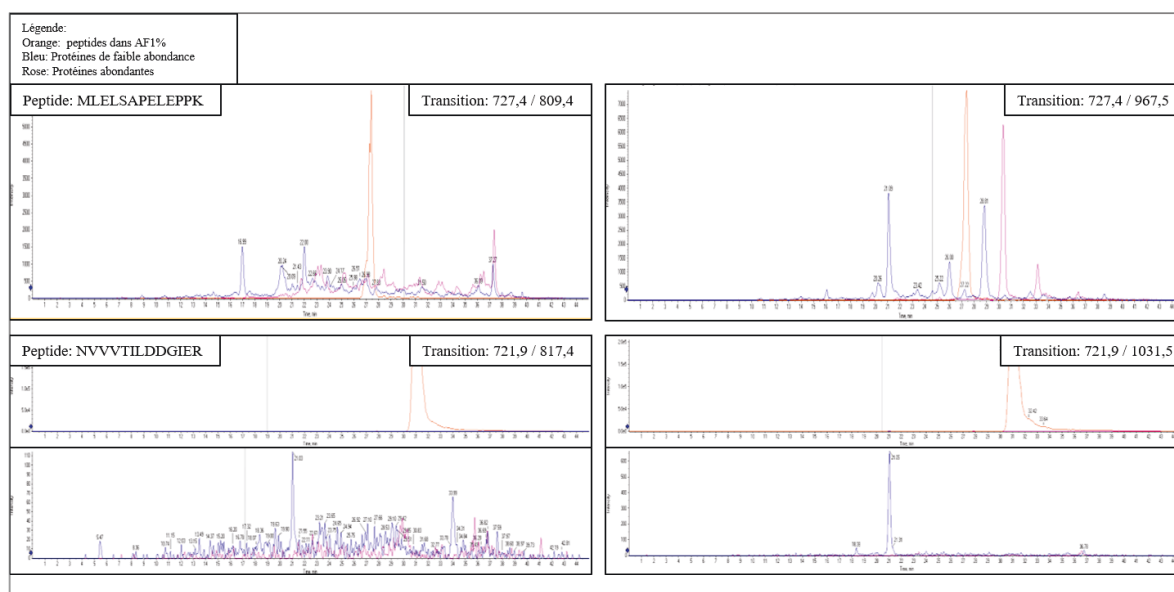


Figure 11. Immunodéplétion des protéines abondantes avec un système MARS14

Les protéines abondantes d'un ensemble de 5 plasmas de patients atteints d'un CaP de stade avancé ont été déplétées sur une colonne centrifuge MARS14 et analysées par pseudoMRM. Les chromatogrammes d'ions extraits des transitions de PACE4 pour les peptides MLELSAPELEPPK et NVVVTILDDGIER sont illustrés. Le tracé bleu est l'échantillon déplété des protéines abondantes, le tracé rose est l'échantillon contenant les protéines abondantes ciblées par la colonne MARS14 et le tracé orange représente les peptides synthétiques dans 1 % AF. Plusieurs pics sont observables, mais aucun ne correspond aux ions de PACE4 suivis pseudoMRM.

4.1.3 Immunoprécipitation couplée à l'analyse pseudoMRM

4.1.3.1 Sélection des billes

Alors, des essais d'IP-pseudoMRM ont été mis au point pour concentrer la PACE4 avant l'analyse MS. En plus d'enrichir PACE4 dans l'échantillon, l'IP permet d'éliminer les protéines abondantes de l'échantillon avant l'analyse. Précédemment, les analyses ProteinPilot faites pour identifier les peptides de PACE4 ont décelé près de 600 protéines uniques dans chacune des analyses, liées possiblement non spécifiquement sur les billes. De plus, en incubant des billes magnétiques dans un milieu de culture de cellules surexprimant PACE4-CtCons, il est possible d'observer une quantité non négligeable de PACE4 liant de façon non spécifique les billes (Figure 12). En conséquence, la sélection de la bille pour l'IP est primordiale pour assurer la spécificité des dosages. Huit billes de différentes compagnies et ayant différentes fonctions chimiques à leur surface ont été testées (Figure 12). Les billes (20 μ L) ont été incubées sans traitement préalable dans 500 μ L de milieu de cellules surexprimant hPACE4-CtCons.

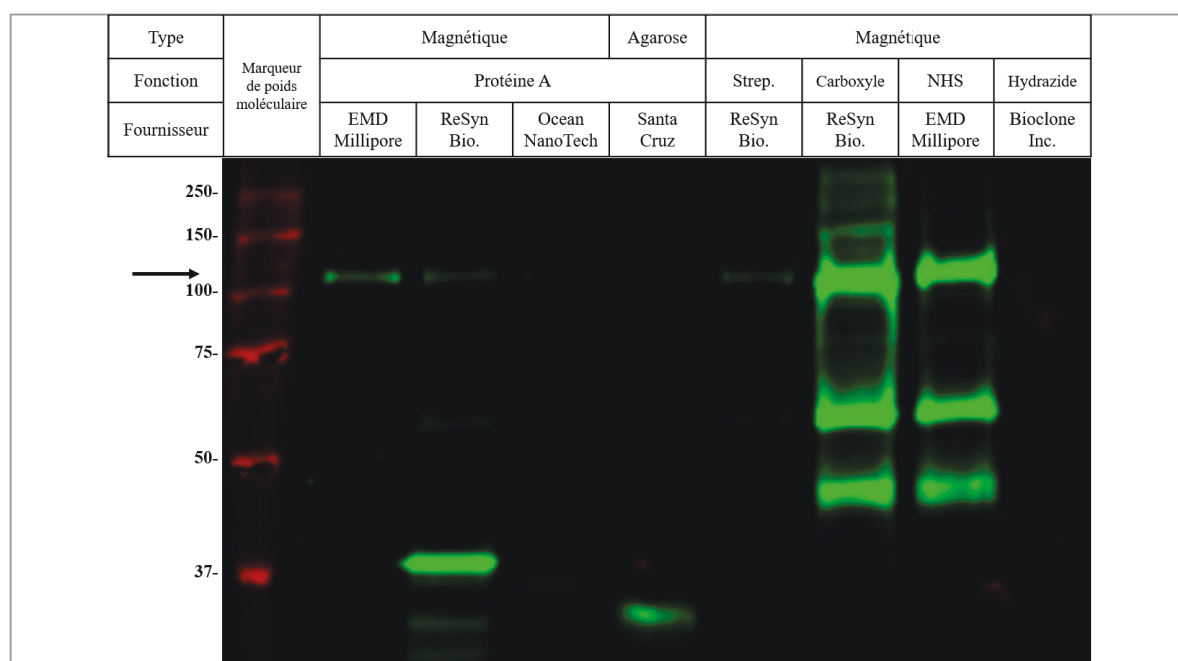


Figure 12. Liaison non spécifique de PACE4 sur plusieurs billes magnétiques

Différents types de billes provenant de différentes compagnies ont été incubées dans un milieu de culture de cellules HEK293FT surexprimant hPACE4-CtCons.

L'immunobuvardage de type western avec l'anti-V5 montre l'interaction non spécifique de PACE4 (flèche noire) sur plusieurs billes disponibles au laboratoire.

Des interactions non spécifiques de PACE4 (≈ 97 kDa) ont été observées sur 5 des 8 billes testées. Aucune interaction n'est observable sur les billes d'agarose fonctionnalisées à la protéine A de Santa Cruz, sur les billes hydrazides de la compagnie Bioclone Inc et sur les billes magnétiques de la compagnie Ocean NanoTech. Pour la suite de la mise au point, une bille magnétique de la compagnie Ocean NanoTech, fonctionnalisée à la streptavidine a été sélectionnée. En utilisant cette bille, les interactions entre les immunoglobulines présentes dans le plasma et pouvant causer de l'interférence sont réduites au maximum. De plus, le magnétisme de la bille facilite grandement l'expérimentation. Les anticorps devaient donc être biotinylés.

4.1.3.2 Validation des anticorps produits au laboratoire

Pour discriminer les isoformes de PACE4, deux anticorps contre les domaines C-terminaux consensuel (anti-CtCons) et alternatif (anti-CtAlt) de PACE4 ont été produits. Un troisième anticorps dirigé contre le domaine P (anti-domaine P) a également été préparé, puisque très peu d'anticorps commerciaux reconnaissant PACE4 sont disponibles. Un monoclonal recombinant de la compagnie AbCam (anti-PACE4 (AbCam)) est l'un des seuls anticorps disponibles permettant de détecter PACE4 à des niveaux endogènes par immunobuvardage western. Aucune information sur l'épitope de cet anticorps n'est cependant disponible. Avec ces anticorps, la distinction entre PACE4-CtCons et PACE4-CtAlt pourrait se faire sur la base du peptide en C-terminale de la PACE4-CtAlt.

Les protéines recombinantes ont été utilisées pour générer des courbes standards avec les anticorps produits pour l'essai afin de confirmer que les anticorps puissent reconnaître de façon dose dépendante les bonnes isoformes. À priori, des cellules HEK293FT ont été transfectées avec les vecteurs pcDNA3,1-hPACE4-CtCons et pcDNA3,1-hPACE4-CtAlt et l'expression de PACE4 a été confirmée par immunobuvardage western (Figure 13). Une quantité équivalente de lysat cellulaire (15 μ g) a été déposée dans les puits et un ratio de 3,4 entre la somme des pixels de l'immunodétection de PACE4-CtAlt et la somme des pixels de PACE4-CtCons a pu être établi. Le volume contenant 15 μ g de lysat étant relativement

équivalent pour chaque construction, il est possible de conclure qu'une plus grande quantité de PACE4-CtAlt est contenue dans un volume équivalent comparativement à la PACE4-CtCons.

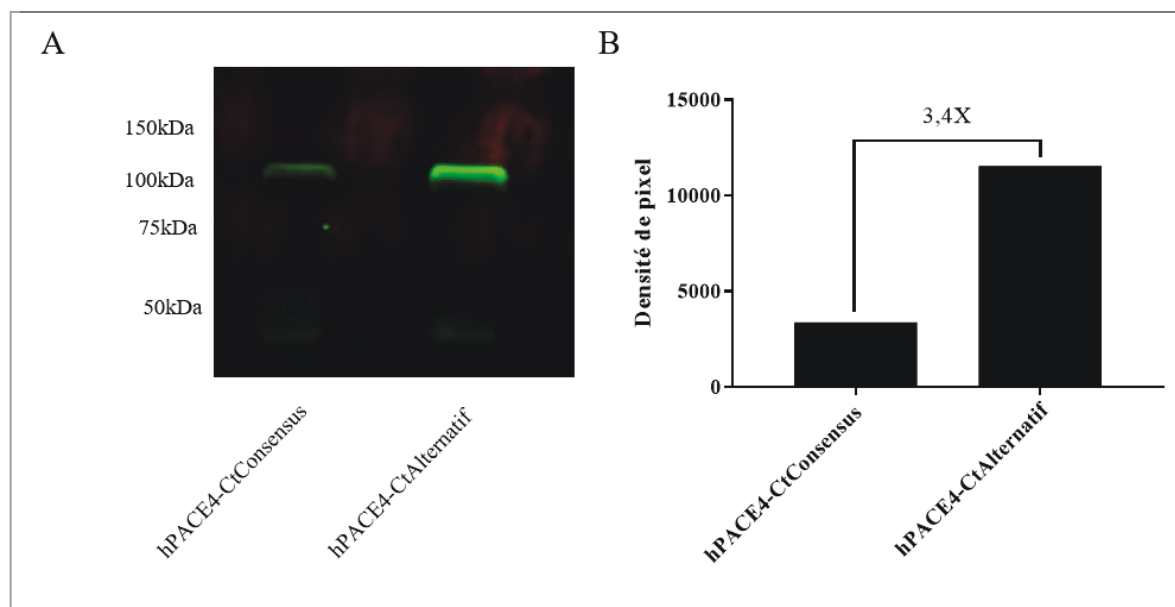


Figure 13. Expression de PACE4-CtCons et PACE4-CtAlt dans les HEK293FT

A) L'immunobuvardage western avec l'anti-V5 montre l'expression des deux isoformes de PACE4 dans les lysats cellulaires (15 µg) d'HEK293FT transfectés avec pcDNA3,1-hPACE4-CtCons ou pcDNA3,1-hPACE4-CtAlt. B) Le graphique illustre la somme de l'intensité des pixels des bandes de PACE4 sur le gel. Un ratio de 3,4 peut être calculé entre la somme des pixels de la PACE4-CtAlt et la PACE4-CtCons.

Ensuite, pour faire les courbes standards, des volumes croissants de lysat cellulaire (0 µL – 50 µL) ont été ajoutés à du plasma de souris pour mimer la complexité du plasma humain et la PACE4 a été immunoprécipitée avec l'aide de 5 µg des anticorps maison. Premièrement, avec l'anti-domaine P (Figure 14A), les AUC augmentent quand 25 µL de lysat cellulaire sont ajoutés et ce, avec de la PACE4-CtCons ou la PACE4-CtAlt. La forme alternative semble être moins bien reconnue par l'anticorps puisque les signaux sont aussi intenses entre les deux formes malgré que dans un volume équivalent, il devrait y avoir plus de PACE4-CtAlt (Figure 13). Aussi, les transitions du peptide NVVVTILDDGIER sont plus intenses que celle du peptide MLELSAPELEPPK, ce qui est inhabituel puisqu'il a été montré précédemment que les transitions du peptide MLELSAPELEPPK sont plus sensibles. Un

bruit de fond pour les transitions du peptide NVVVTILDDGIER peut cependant être décelé quand aucune PACE4 n'est ajoutée au plasma. Ce signal contaminant peut être variable entre les échantillons et explique possiblement la différence observée.

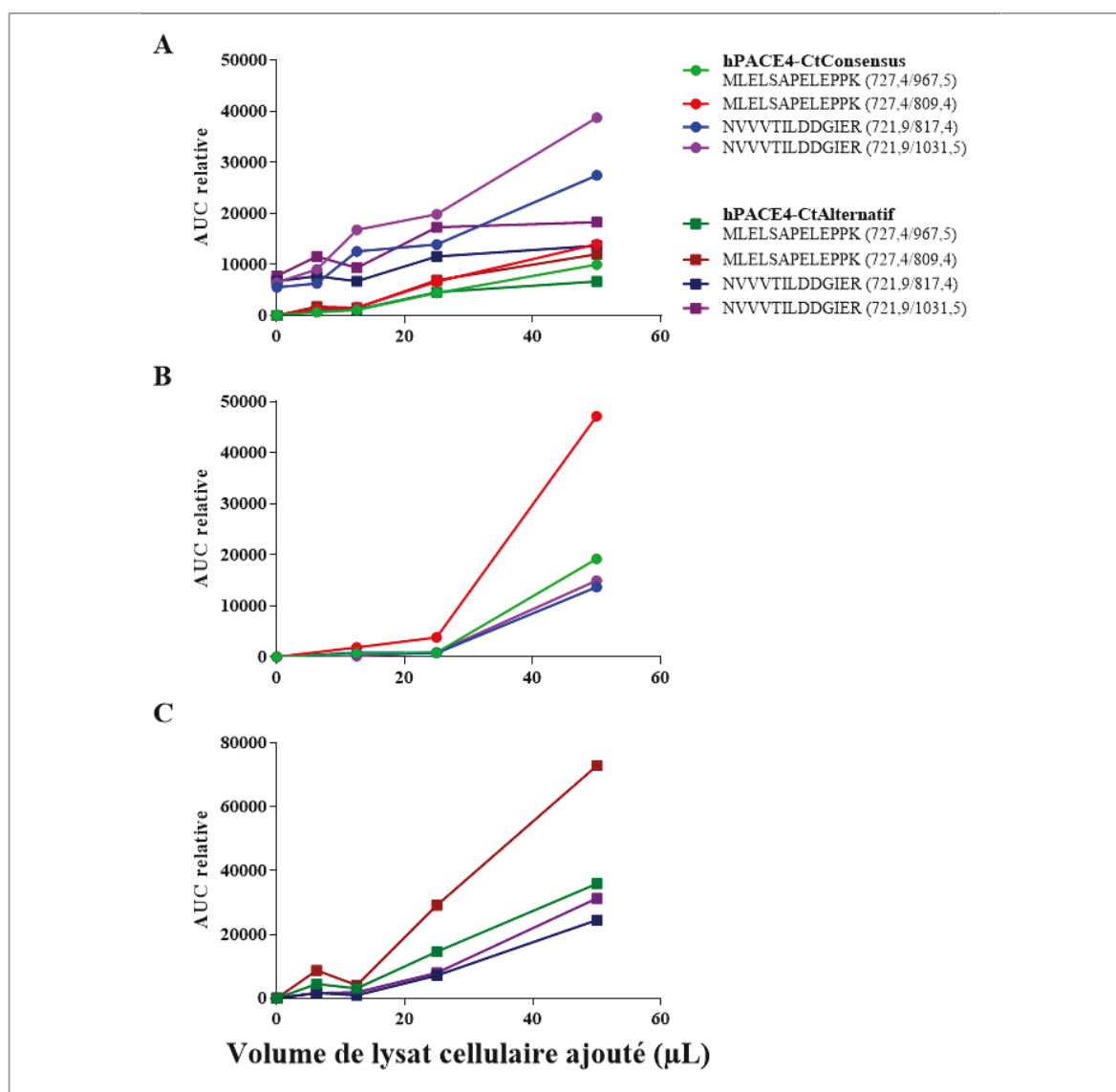


Figure 14. Validation des anticorps produits au laboratoire

Les courbes décrivant l'AUC de chaque transition en fonction du volume de lysat cellulaire ajouté ont été générées par l'IP-pseudoMRM de hPACE4-CtCons ou hPACE4-CtAlt avec les anticorps A) anti-domaine P B) anti-CtCons et C) anti-CtAlt. Pour l'anti-domaine P, les deux isoformes de PACE4 ont été testées. La PACE4-CtCons est représentée par des points sur les graphiques et la PACE4-CtAlt est représentée par des carrés.

Avec l'anti-CtCons, les signaux obtenus sont faibles et fluctuants dans le bruit de fond (données non illustrées). Par conséquent, la quantité d'anti-CtCons utilisée pour valider l'anticorps a été doublée à 10 µg. La courbe obtenue (Figure 14B) fluctue dans le bruit de fond pour les petites quantités de PACE4, mais l'intensité du signal augmente drastiquement quand 50 µL de PACE4-CtCons sont ajoutés dans le plasma. La courbe est semblable avec l'anti-CtAlt (Figure 14C). Quand 25 µL de PACE4-CtAlt sont ajoutés au plasma, le signal grimpe drastiquement et augmente davantage avec 50 µL. En bref, les anticorps semblent reconnaître les isoformes respectives de façon volume dépendante, mais les courbes atteignent rapidement les limites de détection de l'essai. L'anti-CtCons a une sensibilité légèrement inférieure aux autres anticorps puisque la quantité d'anticorps a été doublée.

Enfin, la spécificité des anticorps anti-CtCons et anti-CtAlt a été validé en tentant d'immunoprécipiter de la PACE4-CtAlt avec l'anti-CtCons et vice et versa (Figure 15). Cette validation a été faite avec 25 µL de lysat dilué dans un tampon PBS. Aucun signal n'est observable quand la PACE4-CtAlt est immunoprécipitée avec l'anti-CtCons et un très faible signal (entre 120 u et 941 u d'AUC) est détecté par l'IP-pseudoMRM de la PACE4-CtCons avec l'anti-CtAlt. Donc, les anticorps dirigés contre les C-terminaux sont spécifiques aux isoformes contre lesquelles ils sont dirigés.

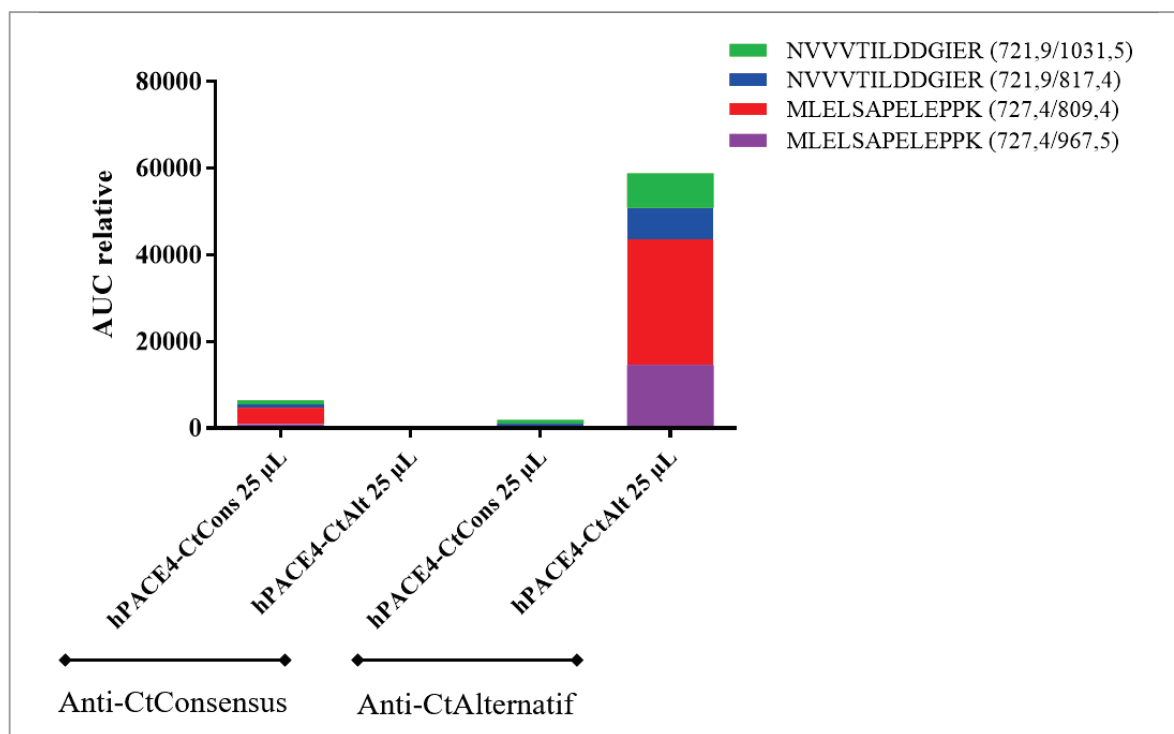


Figure 15. Spécificité des anticorps anti-CtConsensus et anti-CtAlternatif

Le graphique montre les AUC relatives pour chaque transition, obtenues par l'IP-pseudoMRM avec les anticorps anti-CtCons et anti-CtAlt sur 25 µL de lysat cellulaire de cellules HEK293FT surexprimant PACE4-CtCons ou PACE4-CtAlt dans un tampon PBS. Ces résultats suggèrent que les anticorps sont spécifiques.

4.1.3.3 Seule l'isoforme PACE4-CtCons est détectable dans le plasma humain

Les anticorps (15 µg) anti-domaine P, anti-CtCons, et anti-CtAlt ont par la suite été utilisés en IP-pseudoMRM dans 5 plasmas humain de patients atteints d'un CaP, de différents stades pathologiques (1 mL) provenant de la biobanque pour caractériser lesquelles des isoformes de PACE4 sont détectables dans le plasma (Figure 16). Dans les plasmas analysés, aucun signal associé aux transitions de PACE4 n'est observable avec l'anticorps anti-CtAlt et des niveaux faibles ont été détectés avec l'anti-CtCons. L'AUC des transitions de PACE4 est plus élevée avec l'anti-domaine P. Pour la détection de PACE4, un volume de 1 mL de plasma ont été requis par échantillon puisqu'avec des volumes plus petits, PACE4 était indétectable (données non illustrées). En discriminant les isoformes de PACE4 par l'immunodétection de l'extrémité C-terminale, un minimum de 2 mL serait donc requis par échantillon, limitant considérablement le nombre de plasmas disponibles pour l'analyse par manque de volume. Dans ces conditions, pour la suite des expériences, la stratégie pour

détecter PACE4-CtAlt a été changée. Le peptide LETFWVVTGR a été ajouté dans la méthode pseudoMRM permettant par le fait même d'étudier les deux isoformes en une seule IP avec l'anti-domaine P. En somme, il ne semble y avoir que de la PACE4-CtCons dans le plasma.

Par contre, la présence dans le plasma d'exopeptidases dégradant les protéines par les extrémités N-terminale et C-terminale pourrait expliquer en partie la difficulté de doser cette isoforme. Ceci pourrait également expliquer l'absence de cohérence entre les niveaux de PACE4 décelés avec l'anti-domaine P et l'anti-CtCons. Par exemple, dans le plasma #5 (Figure 16), des niveaux de PACE4 assez élevés ont été dosés avec l'anti-domaine P, mais ces niveaux se transforment en un faible signal lorsque l'anti-CtCons est utilisé. Aussi, les niveaux semblent généralement plus élevés quand l'anti-domaine P est employé comparativement à l'anti-CtCons. Puisque l'anti-domaine P cible une région près des peptides suivis en pseudoMRM, la reconnaissance de l'épitope par cet anticorps est probablement moins affectée par ces protéases, facilitant par le fait même la détection de PACE4. L'hypothèse que la PACE4-CtAlt soit présente dans le plasma ne peut par conséquent pas être mise de côté. Cette variabilité pourrait également être compensée en partie par l'ajout d'un élément normalisateur à l'essai comme la protéine isotopiquement marquée.

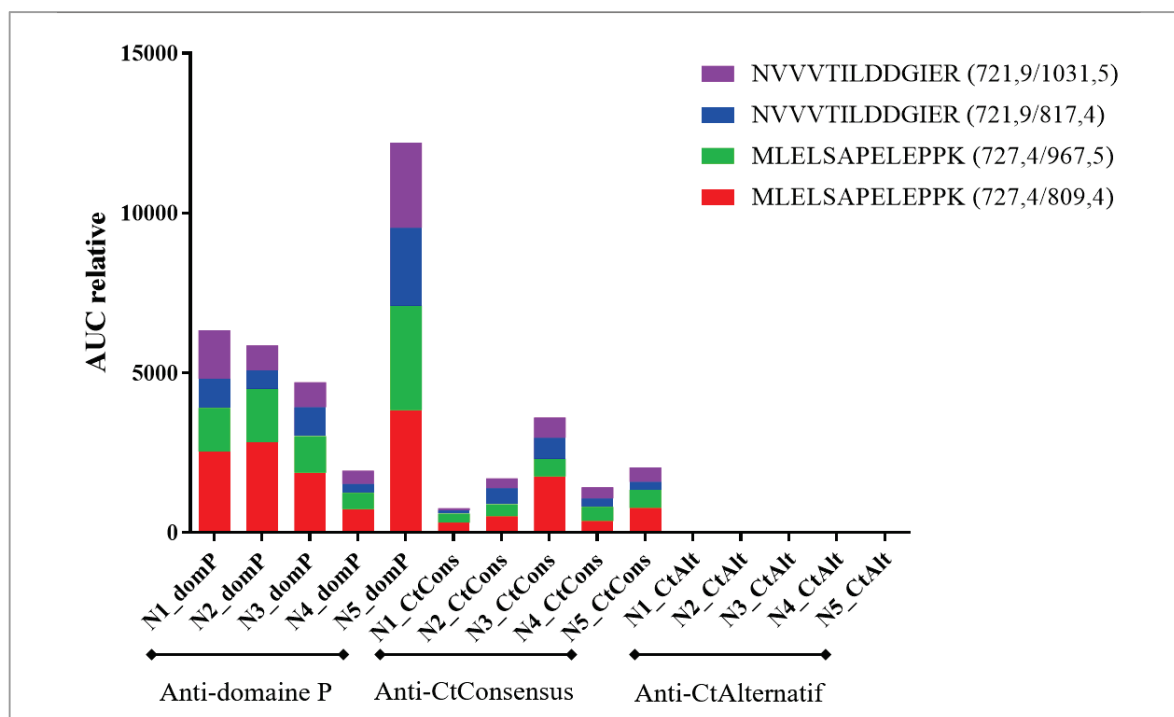


Figure 16. Détection de PACE4 dans le plasma humain de patients atteints d'un CaP

L'histogramme montre l'AUC relative des transitions de PACE4 qui a été calculée avec les chromatogrammes d'ions extraits obtenus par l'IP-pseudoMRM dans 5 plasmas de patients atteints d'un CaP de différents stades pathologiques, avec les anticorps anti-domaine P, anti-CtCons et anti-CtAlt. Un signal est décelé avec l'emploi de l'anti-domaine P et l'anti-CtCons, mais il n'y a aucun signal avec l'anti-CtAlt.

4.1.4 Purification de la PACE4 recombinante isotopiquement marquée

La normalisation de l'essai est primordiale à la robustesse et à la justesse des résultats. Ainsi, les formes isotopiquement marquées de PACE4-CtCons (Figure 17) et PACE4-CtAlt (Figure 18) ont été produites dans un milieu SILAC et la purification a été conduite sur une résine de nickel en conditions dénaturantes. L'élution des protéines de la résine a été vérifiée par buvardage en point avec l'anti-V5 pour identifier les fractions contenant de la PACE4 (Figure 17A ; Figure 18A). Le volume de résine de nickel qui a été utilisé ne semble pas être suffisant pour lier toute la PACE4 présente dans les lysats cellulaires, puisque l'immunodétection est tout de même assez forte dans les fractions non liées sur la colonne (FT) et dans les premiers lavages de la colonne (W1). Un plus grand volume ou un second passage sur la colonne aurait pu être fait pour purifier la majeure partie de la PACE4. L'analyse TCE sur gel d'acrylamide des fractions d'élution (Figure 17B ; Figure 18B)

montre que les premières fractions positives (hPACE4-CtCons : E3-E5 ; hPACE4-CtAlt : E2-E5) contiennent une grande part de protéines, autre que PACE4, liées non spécifiquement sur la résine. En effet, plusieurs bandes majoritaires sont observables dans ces pistes. Pour les autres pistes, le contenu protéique est faible, mais il y a une bande autour de 100 kDa qui détonne de l'ensemble du gel. Ainsi, les fractions E3 à E5 et E6 à E18 pour hPACE4-CtCons et les fractions E2 à E5 et E6 à E20 pour hPACE4-CtAlt ont été mis en communs et le dessalage des fractions a été fait par filtre centrifuge (Amicon 30K).

Tableau 5. Dosage protéique des fractions de purification

Échantillon	Concentration (µg/µl)	Quantité (µg)	Estimé de la pureté (%)
PACE4-CtConsensus pool 3-5	0,178	37,380	4,55
PACE4-CtConsensus pool 6-18	0,075	15,000	5,90
PACE4-CtAlternatif pool 2-5	0,181	36,200	4,36
PACE4-CtAlternatif pool 6-20	0,000	0,000	7,91*
Recouvrement de hPACE4-CtAlternatif pool 6-20	0,011	1,650	<i>nd</i>

*L'estimation de la pureté a été faite sur la piste pré-Amicon puisque la piste post-Amicon est complètement vide.

Après la filtration et le changement de tampon, le rendement de la purification est tout de même faible, en considérant la pureté estimée dans les échantillons. Seulement quelques microgrammes de protéines ont été récupérés (Tableau 5.) La pureté de la PACE4 dans les échantillons varie entre 4,36 % et 7,91 %. Pour le groupe 6-20 de hPACE4-CtAlt, la protéine semble avoir été perdue dans les lavages du filtre (Figure 18D), puisqu'un signal en immunobuvardage western est observé dans la piste du filtrat (pool 6-20 FT amicon). Elle a été récupérée sur un second Amicon 30K (données non illustrées), mais moins de 2 µg de protéines de hPACE4-CtAlt ont été recouvrés dans cette fraction. Par conséquent, la méthode de purification devra être modifiée pour améliorer le rendement et la pureté des formes lourdes de PACE4.

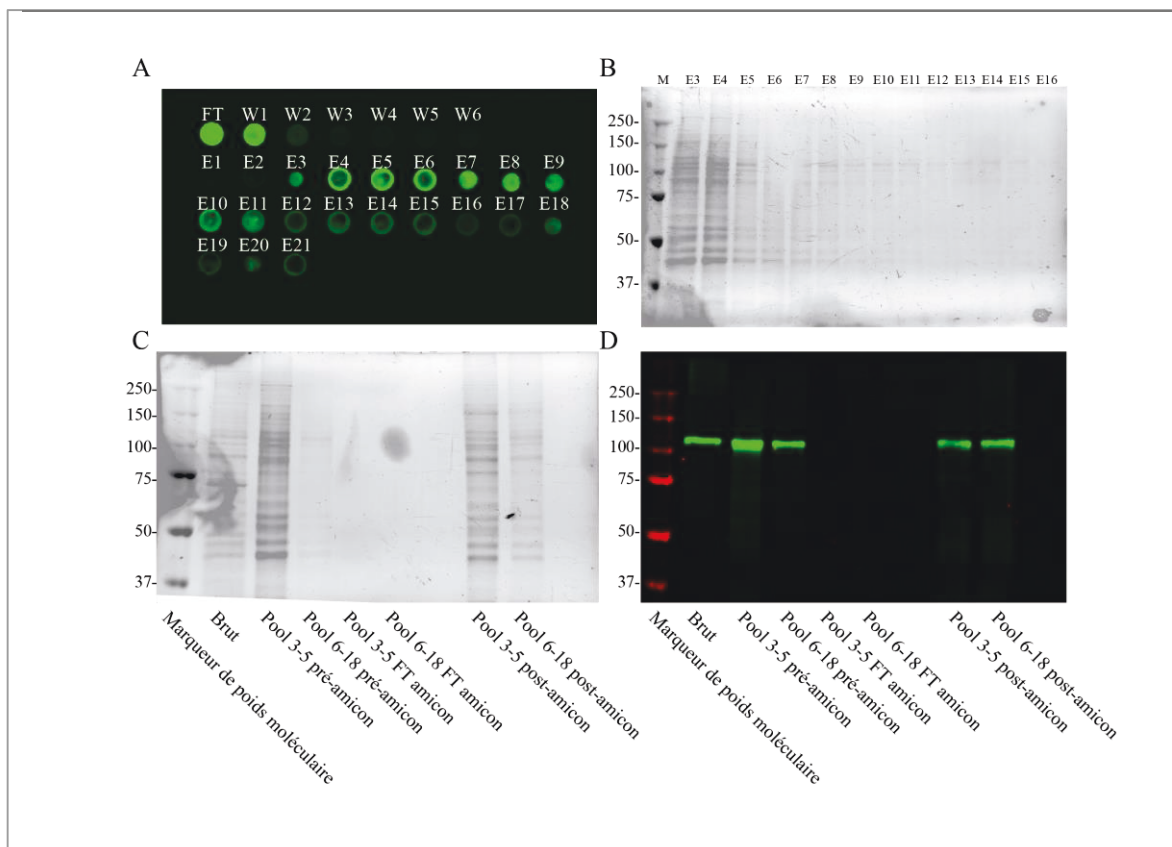


Figure 17. Purification de PACE4-CtCons isotopiquement marquée

A) Identification des fractions positives d'élution de la résine de nickel par immunobuvardage en point avec l'anti-V5. FT : Fraction non liée sur la résine de nickel, W : Lavages, E : Fractions d'élution **B)** Analyse du contenu protéique des fractions d'élution positives, par TCE sur gel de polyacrylamide. M : Marqueur de poids moléculaire **C)** TCE sur gel de polyacrylamide permettant de visualiser la perte protéique causée par le dessalage sur filtre centrifuge (Amicon). La fraction brute est une aliquote de la fraction non liée sur la résine de nickel, les groupes « pré-amicon » sont des combinées de fractions positives avant le dessalage, les fractions « FT » sont les filtrats et les fractions « post-Amicon » sont les échantillons dessalés et purifiés définitifs. **D)** Confirmation de la présence de PACE4 dans les fractions avant et après le dessalage par buvardage western avec l'anti-V5.

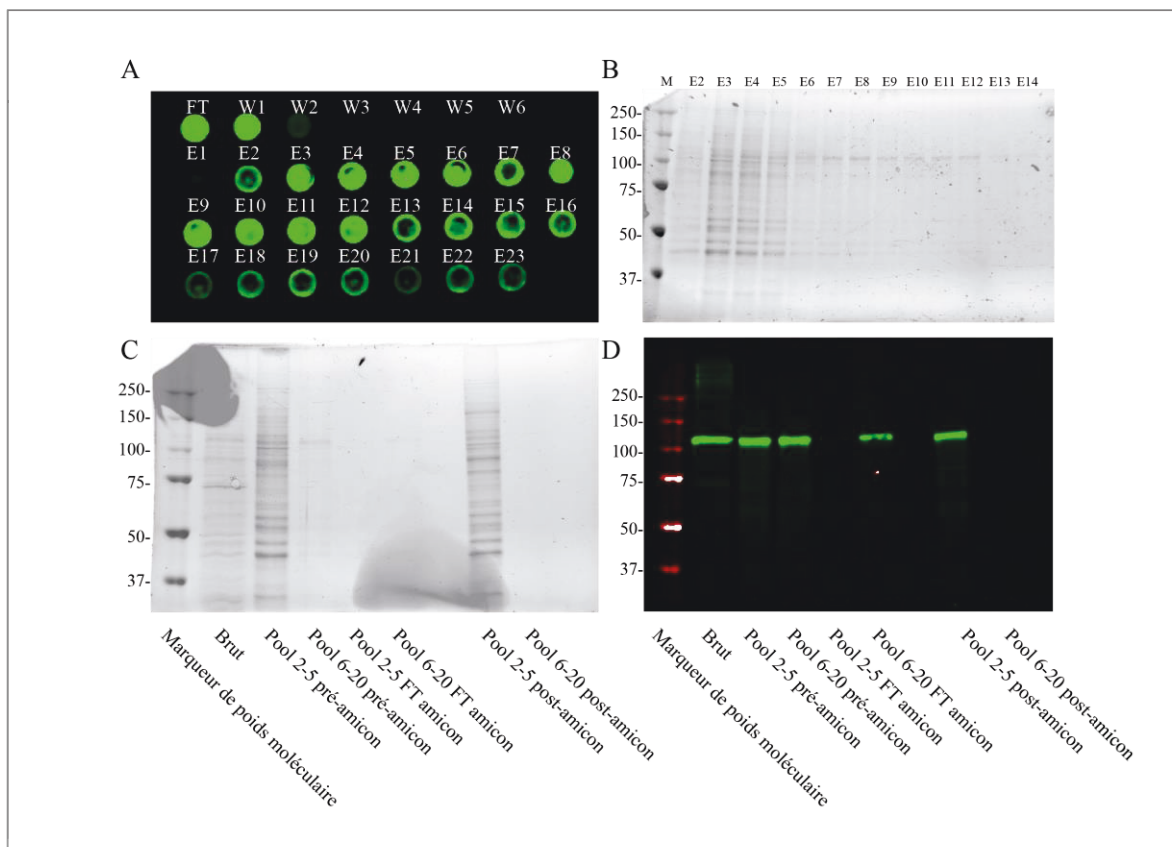


Figure 18. Purification de PACE4-CtAlt isotopiquement marquée

A) Identification des fractions positives d'élution de la résine de nickel par immunobuvardage en point avec l'anti-V5. FT : Fraction non liée sur la résine de nickel, W : Lavages, E : Fractions d'élution **B)** Analyse du contenu protéique des fractions d'élution positives, par TCE sur gel de polyacrylamide. M : Marqueur de poids moléculaire **C)** TCE sur gel de polyacrylamide permettant de visualiser la perte protéique causée par le dessalage sur filtre centrifuge (Amicon). La fraction brute est une aliquote de la fraction non liée sur la résine de nickel, les groupes « pré-amicon » sont des combinées de fractions positives avant le dessalage, les fractions « FT » sont les filtrats et les fractions « post-Amicon » sont les échantillons dessalés et purifiés définitifs. **D)** Confirmation de la présence de PACE4 dans les fractions avant et après le dessalage par buvardage western avec l'anti-V5.

4.1.4.1 Efficacité du marquage isotopique

Pour vérifier l'efficacité de la méthode de marquage isotopique, toutes les protéines purifiées, hPACE4-CtCons et hPACE4-CtAlt, ont été mises en commun et analysées en IP-pseudoMRM avec l'anti-domaine P (Figure 19). Des nouvelles méthodes pseudoMRM ont été ajoutées à l'essai pour faire le dosage des peptides lourds. Les paramètres optimisés du MS pour les transitions légères ont été calqués pour chaque transition lourde correspondante et les m/z suivis ont été ajustés en conséquence (voir Tableau 3 dans la section Matériels et

méthodes). Dans cette analyse, les formes légères et lourdes des peptides ont été vérifiées pour s'assurer qu'aucune PACE4 légère résiduelle ne soit détectable dans l'échantillon. Toutes les transitions lourdes ont des AUC relativement fortes, mais il est possible d'observer des signaux résiduels de PACE4 légère dans les échantillons. Avec les chromatogrammes d'ions extraits, l'efficacité du marquage a été estimée par le calcul suivant :

$$efficacité = \frac{AUC_{lourde}}{AUC_{lourde} + AUC_{légère}} \times 100$$

L'efficacité du marquage a été estimée à au-delà de 85% pour le peptide MLELSAPELEPPK et à plus de 95 % pour les peptides NVVVTILDDGIER et LETFWVVTGR ce qui est tout de même très acceptable en considérant que les cellules ne soient conditionnées dans le milieu SILAC que 24 h avant la transfection. Les cellules ne semblent donc pas avoir assez de temps pour remplacer l'arginine et la lysine légères dans l'ensemble des protéines par les isotopes qui sont ajoutés de façon exogène pour éliminer complètement l'arginine et la lysine légères du système.

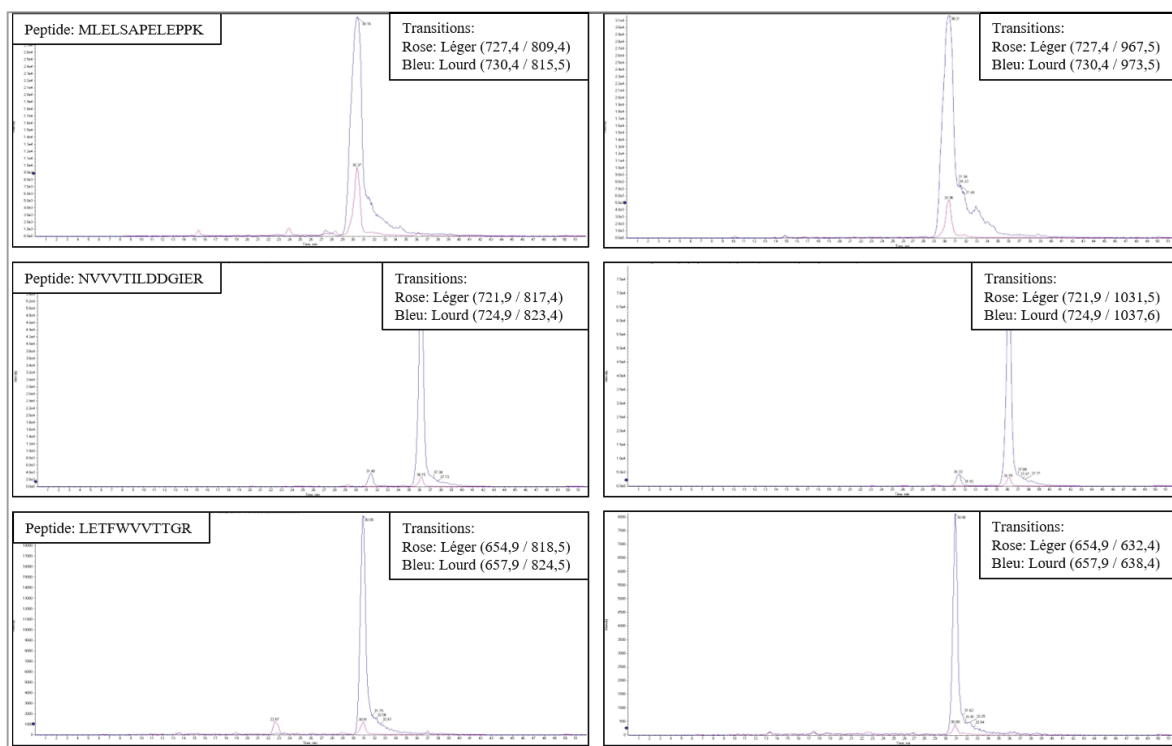


Figure 19. Efficacité du marquage isotopique de PACE4

Les chromatogrammes d'ions extraits des transitions lourdes (tracés bleus) et légères (tracés roses) de PACE4 ont été obtenus par l'IP-pseudoMRM avec l'anti-domaine P de l'ensemble

des protéines (hPACE4-CtCons et hPACE4-CtAlt dans le même échantillon) purifiées sur les colonnes de nickel dans le but d'estimer l'efficacité du marquage isotopique (> 85 % pour le peptide MLELSAPELEPPK ; > 95 % pour les peptides NVVVTILDDGIER et LETFWVVTGR).

4.2 Détection de PACE4 dans l'urine de patients atteints d'un CaP

Pendant les phases exploratoires du projet, quelques échantillons d'urines ont été analysés en parallèle avec des plasmas avec l'anticorps monoclonal recombinant de la compagnie AbCam, étant donné que sa grande sensibilité permet d'immunodétecter PACE4 à des niveaux endogènes par immunobuvardage western. Trois paires de plasma et d'urine provenant des mêmes patients ont été testées par immunobuvardage western avec l'anti-PACE4 (AbCam) et en IP-pseudoMRM (Figure 20). En immunobuvardage western (Figure 20A), une seule bande spécifique autour de 90 kDa a été immunodétectée. Dans les plasmas, en plus d'une bande à 90 kDa, une seconde bande est visible autour d'un poids moléculaire de 100 kDa. Avec ces résultats, l'hypothèse que PACE4 pourrait être dosable dans l'urine semble plausible. Par contre, quand l'essai d'IP-pseudoMRM avec l'anti-PACE4 (AbCam) est conduit dans ces échantillons (Figure 20B), PACE4 est détectable en pseudoMRM seulement dans le plasma. Comparativement à l'IP contrôle, qui est faite avec un lysat cellulaire de HEK293FT surexprimant PACE4-CtCons dans le PBS, les niveaux dans le plasma sont faibles. Il est possible qu'en immunobuvardage western dans ces échantillons (Figure 20A), ce soit la bande autour de 100 kDa dans le plasma qui soit associé à PACE4, mais l'opposition apparente des conclusions dans l'urine a été explorée davantage avec quelques expériences.

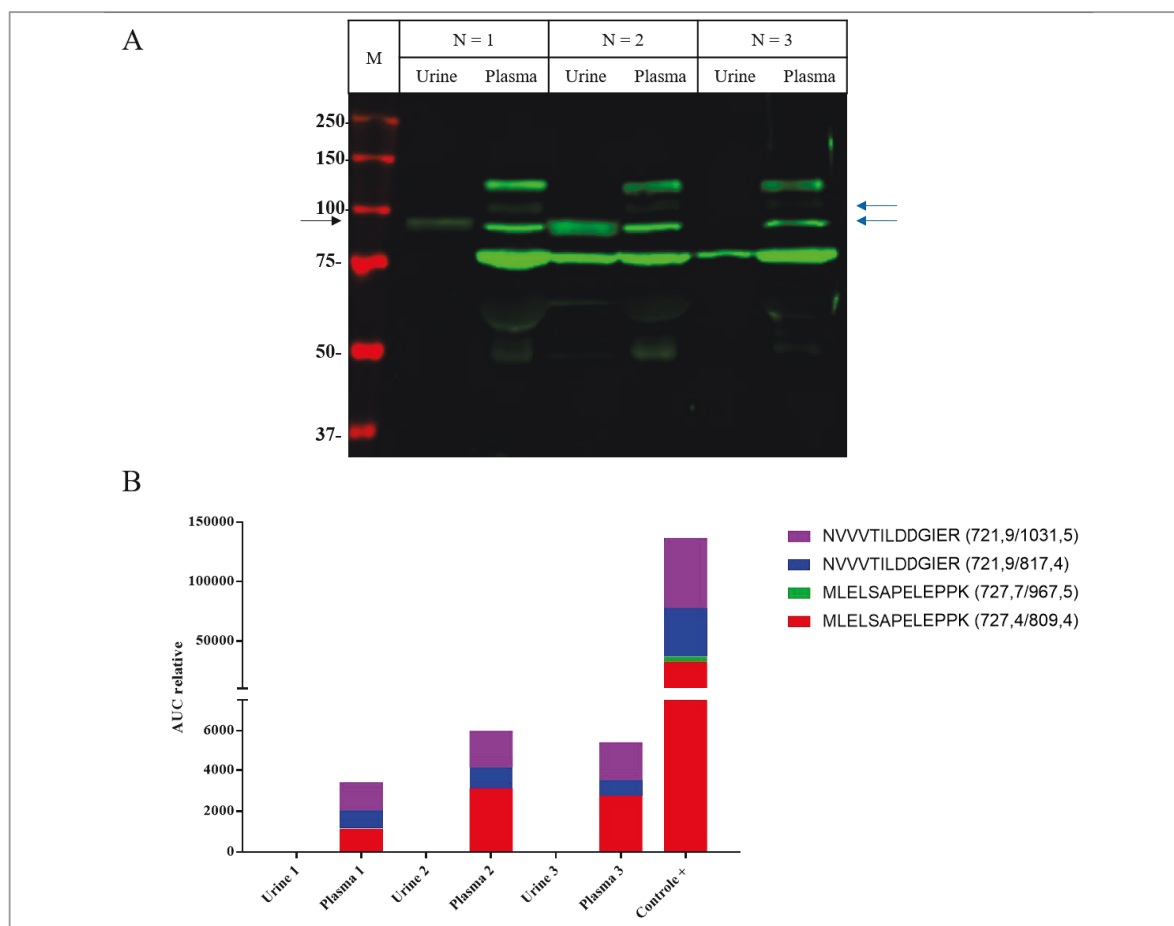


Figure 20. Détection de PACE4 dans l'urine de patients atteints d'un CaP

A) L'immunobuvardage western avec l'anti-PACE4 (AbCam) sur 3 urines et 3 plasmas détecte 1 bande autour de 90 kDa dans les urines humaines (flèche noire) et 2 bandes, autour de 90 kDa et 100 kDa, dans les plasmas (flèches bleues). M : Marqueur de poids moléculaire. **B)** L'IP-pseudoMRM avec l'anti-PACE4 (AbCam) permet de mesurer un signal seulement dans les plasmas. Un contrôle positif est inclus dans l'analyse, soit un lysat de cellules surexprimant PACE4-CtCons. Une interférence avec l'ion 967,5 a été décelée dans les plasmas. Il n'est donc pas représenté dans les plasmas sur le graphique.

Tout d'abord, la détection de la bande à 90 kDa par immunobuvardage western avec l'anti-PACE4 (AbCam) suite à une IP avec un second anticorps, l'anti-domaine P, a été tentée. Une IP avec l'anti-PACE4 (AbCam) et un contrôle négatif d'IP avec des anticorps normaux de lapin ont été inclus dans l'analyse. Seul l'anti-PACE4 (AbCam) a réussi à immunoprécipiter la protéine correspondante à la bande à 90 kDa (Figure 21A). D'un côté, il est possible de supposer une absence totale de PACE4 dans l'urine considérant que l'anti-domaine P n'immunoprécipite pas la bande à 90 kDa, mais la sensibilité supérieure de l'anti-PACE4

(AbCam), comparativement à l'anti-domaine P, peut clairement être démontrée en faisant la même expérience avec de la protéine recombinante (Figure 21B). Pour une quantité d'anticorps équivalente, un ratio de 12,4 peut être calculé entre la somme des pixels de la bande de l'IP monoclonal (AbCam) et celle de l'IP anti-domaine P, démontrant la forte supériorité de l'anticorps monoclonal. En conséquence, il n'est pas possible, avec cette expérience, d'expliquer l'absence de signal en IP-pseudoMRM dans l'urine avec l'anti-PACE4 (AbCam) et c'est à la lumière de cette expérience que la quantité d'anticorps utilisée dans l'IP-pseudoMRM a été triplée à 15 μ g.

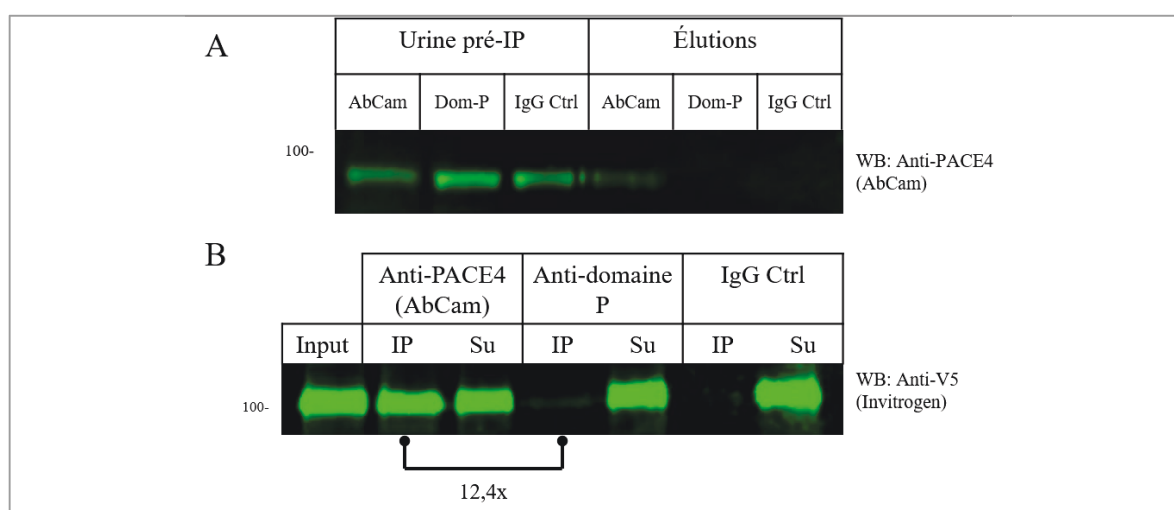


Figure 21. Immunoprécipitation dans l'urine avec l'anti-domaine P

A) L'immunobuvardage western fait avec l'anti-PACE4 (AbCam) révèle l'incapacité d'immunoprécipiter la bande à 90 kDa avec l'anti-domaine P dans l'urine. Dans l'expérience, l'IP avec l'anti-PACE4 (AbCam) a servi de contrôle positif et un contrôle négatif qui consiste en l'IP avec des anticorps normaux non spécifiques de lapin (IgG Ctrl) a aussi été faite. **B)** Pour comparer l'efficacité des anticorps anti-PACE4 (AbCam) et anti-domaine P en IP, l'IP avec ces deux anticorps a été conduite dans un milieu de cellules surexprimant hPACE4-CtCons. L'immunobuvardage western avec l'anti-V5 décèle qu'une faible bande pour l'IP anti-domaine P et une bande très intense pour l'anti-PACE4 (AbCam). Une aliquote équivalente au volume d'élution (25 μ L) du milieu cellulaire a également été incluse sur le gel (input). Un ratio de 12,4 entre l'intensité de la bande de l'IP anti-PACE4(AbCam) et l'anti-domaine P a été calculé avec l'aide du logiciel Image J.

Deux autres expériences ont été faites pour expliquer ces résultats. Tout d'abord, le protéome urinaire a été fractionné sur un système Sage ELF (voir Figure 7 dans la section Matériels et méthodes pour un rappel du principe) et la fraction d'élution contenant la protéine d'intérêt à 90 kDa a été identifiée par immunobuvardage western (Figure 22A-B). La protéine de 90

kDa est visible dans la deuxième fraction d'éluion. Sur le gel TCE, il est possible de voir que plusieurs protéines sont présentes dans cette fraction, mais que le contenu protéique est moins complexe que dans l'urine totale. Cette fraction a donc été analysée par pseudoMRM (Figure 22C). Aucun pic correspondant aux mêmes temps de rétention que les peptides dans l'AF ne peut être observé sur les chromatogrammes d'ions extraits de PACE4.

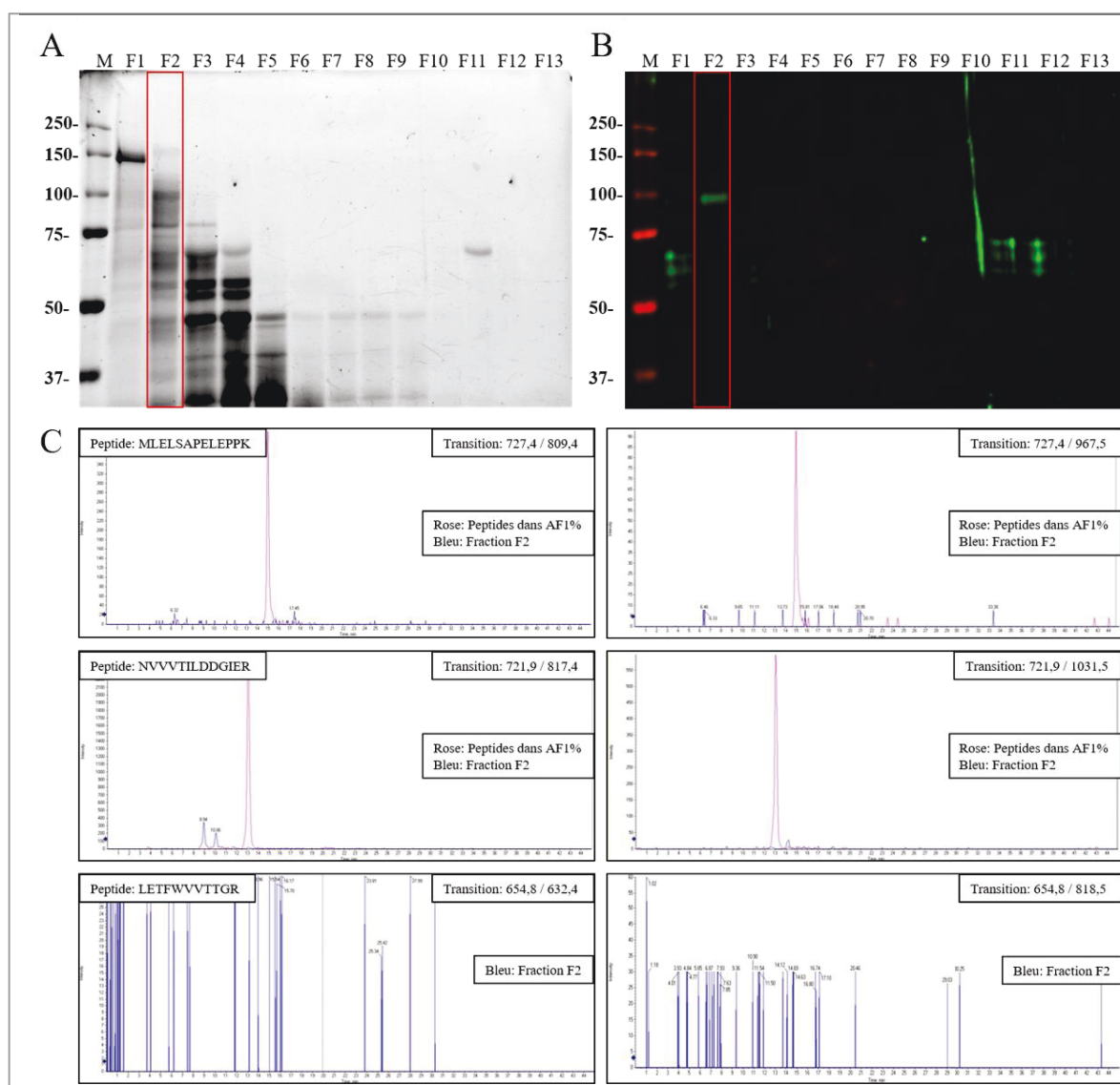


Figure 22. Analyse pseudoMRM des fractions d'éluion du Sage ELF

A) Visualisation, par TCE sur gel d'acrylamide, des protéines éluées du Sage ELF dans chaque fraction. **B)** Le buvardage western avec l'anti-PACE4 (AbCam) permet d'identifier la fraction contenant la bande d'intérêt à 90 kDa de l'urine pour l'analyse en pseudoMRM. M : Marqueur de poids moléculaire. **C)** Les chromatogrammes d'ions extraits révèlent qu'il

n'y aurait pas de PACE4 dans l'urine. Les tracés en bleu sont ceux de la fraction F2 et les tracés roses sont des peptides dans 1 % AF.

Enfin, la dernière expérience qui a été faite est l'excision de la bande à 90 kDa sur un gel de polyacrylamide suivie de l'analyse par pseudoMRM des peptides issus de la digestion trypsique faite sur les fragments de gel. À nouveau, cette expérimentation n'a pas permis de détecter PACE4 dans l'urine (Figure 23). Aucun signal correspondant aux peptides de PACE4 n'a été détecté. Par conséquent, l'ensemble des expériences et des résultats suggère qu'il n'y aurait pas de PACE4 dans l'urine de patients atteints d'un CaP et que la bande sur immunobuvardage de type western pourrait être attribuable à un artéfact.

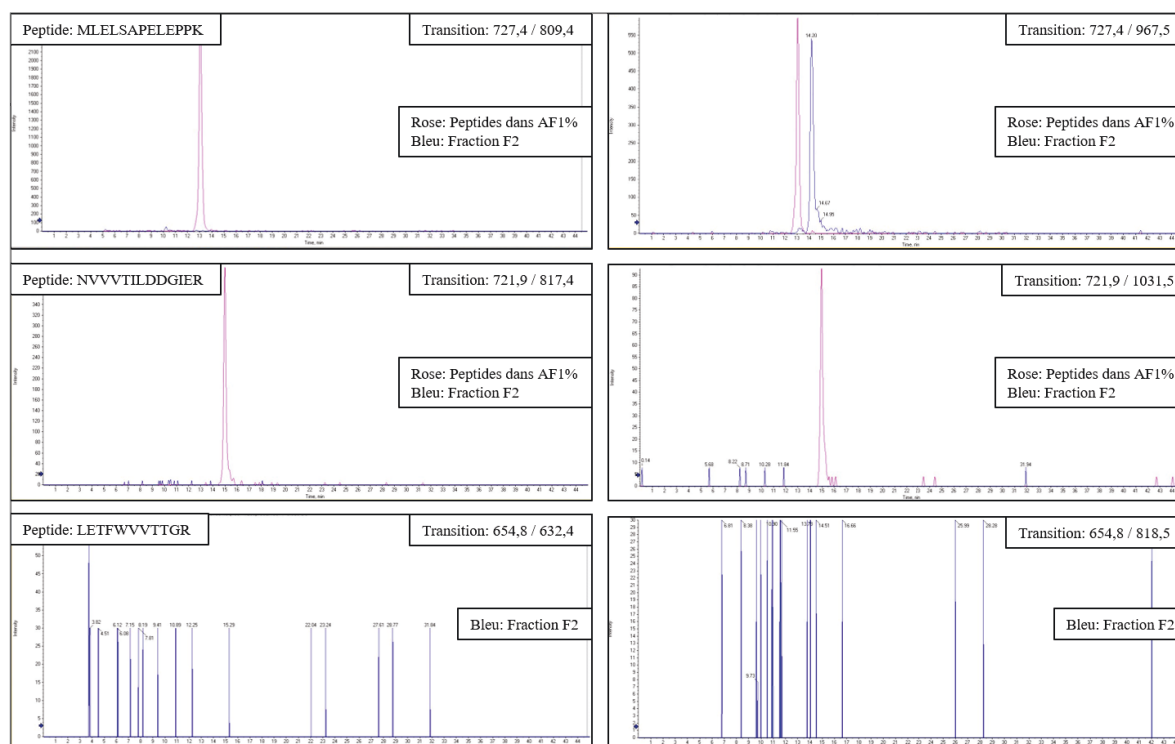


Figure 23. Analyse pseudoMRM de la bande à 90 kDa excisée d'un gel de polyacrylamide

Les chromatogrammes d'ions extraits indiquent qu'aucune PACE4 n'est détectable par pseudoMRM dans l'urine suite à l'excision de la bande à 90 kDa. Les tracés en bleu sont ceux de la fraction F2 et les tracés roses sont des peptides dans 1 % AF.

4.3 Étude comparative chez des patients sains et atteints d'un CaP

Malgré que quelques améliorations doivent être faites à l'essai, il n'en demeure pas moins que cet essai est assez sensible pour détecter PACE4-CtCons dans les prélèvements sanguins.

Ainsi, une étude comparative a été conduite dans les prélèvements sanguins pour explorer si les niveaux relatifs de PACE4-CtCons ou PACE4-CtAlt pourraient varier de façon drastique en fonction des différentes données cliniques disponibles qui sont associées aux échantillons. En effet, l'essai IP-pseudoMRM avec l'anti-domaine P a été conduit sur 33 échantillons sanguins provenant de patients recrutés au CHUS, 8 patients sans évidence de cancer et 25 patients atteints d'un adénocarcinome prostatique et ayant subi une prostatectomie radicale (Tableau 6). L'âge moyen des patients est semblable entre les groupes (66,4 et 63,3, valeur de $p : 0,4$). Le niveau moyen d'APS dans le sang des patients atteints d'un CaP ($9,33 \mu\text{g/L}$) est plus élevé que dans le sang des patients contrôles ($1,45 \mu\text{g/L}$), ce qui est normal puisque les patients sains ont été choisis, en outre, en fonction d'un niveau d'APS considéré normal ($< 4 \mu\text{g/L}$). Parmi les patients atteints d'un CaP, le score de Gleason pathologique du foyer le plus agressif est de 6 pour 7 patients, 7 pour 11 patients et 8 pour 7 patients. Dans la cohorte de patients choisie pour l'expérience, le stade pathologique des patients est majoritairement pT2, c'est-à-dire un cancer dont la tumeur est palpable, mais confinée à la prostate.

Tableau 6. Caractéristiques cliniques des patients inclus dans l'analyse

	Total (N=33)	Sain (N=8)	CaP (N=25)
Age moyen (années) (min - max)	64,1 (50 - 90)	66,4 (50 - 90)	63,3 (53 - 72)
Niveau d'APS moyen (µg/L) (min - max)	7,42 (0,65 - 36,60)	1,45 (0,65 - 3,17)	9,33 (1,04 - 36,60)
Touché rectal anormal (%)	10 (30,3)	0 (0,0)	10 (40,0)
Poids moyen de la prostate (g) (min - max)	66,6 (34,0 – 244,0)	NA	66,6 (34,0 – 244,0)
Score gleason pathologique(N)			
6	7	0	7
(3+3)	7	0	7
7	11	0	11
(3+4)	7	0	7
(4+3)	4	0	4
8	7	0	7
(4+4)	5	0	5
(3+5)	2	0	2
Stade pathologique*			
pT2	15	0	15
pT3	6	0	6
pT4	1	0	1
nd	3	0	3

* pT2 : tumeur palpable confinée à la prostate, pT3 : tumeur avec extension extracapsulaire, pT4 : tumeur envahissant le rectum et la vessie, *nd* : non déterminé

Dans tous les spécimens sanguins analysés, les deux peptides communs de PACE4 (MLELSAPELEPPK et NVVVITILDDGIER) ont été détectés avec confiance (2 transitions par peptide), sans interférence et aux bons temps de rétention (Figure 24). Pour ce qui est du peptide à l'extrémité CtAlt, LETFWVVTGR, il n'est observé dans aucun des échantillons.

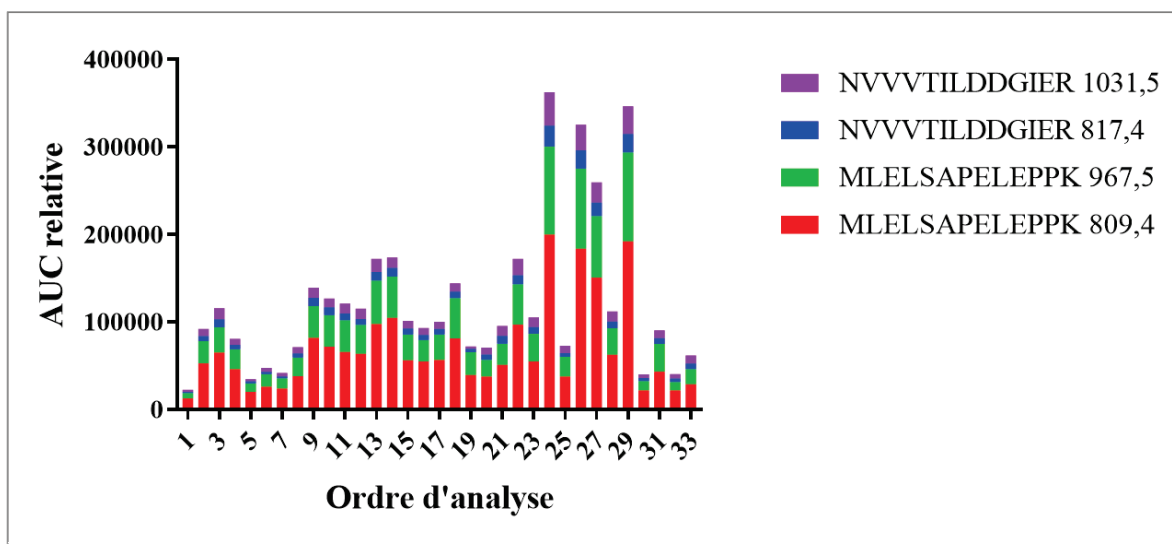


Figure 24. Analyse séquentielle des 33 prélèvements sanguins inclus dans l'étude

L'histogramme montre, dans l'ordre d'analyse, l'AUC relative des transitions de PACE4 mesurée dans les prélèvements sanguins en IP-pseudoMRM avec l'anti-domaine P.

4.3.1 Normalité de la distribution des données

Pour la conformité de l'analyse statistique, la normalité de la distribution des AUC a été vérifiée visuellement (Figure 25) ainsi qu'avec le test de Shapiro–Wilk (Tableau 7) pour chaque transition et pour la somme de l'AUC des transitions de PACE4. Les données ont également été transformées sur une échelle logarithmique de bases 2 et 10 ainsi que par la racine carrée des valeurs afin que les distributions soient aussi normales que possible.

Tableau 7. Test de Shapiro-Wilk pour déterminer la normalité des distributions

		MLELSAPELEPPK		NVVVTILDDGIER		AUC totale
		809,4	967,5	817,4	1031,5	
Sans transformation	Statistique (W)	0,815	0,813	0,818	0,793	0,809
	Valeur de p	6,24E-05	5,86E-05	7,33E-05	2,42E-05	4,89E-05
Log ₂	Statistique (W)	0,977	0,968	0,974	0,960	0,975
	Valeur de p	0,691	0,437	0,612	0,265	0,616
Log ₁₀	Statistique (W)	0,977	0,968	0,974	0,960	0,975
	Valeur de p	0,691	0,437	0,612	0,265	0,616
Racine carrée	Statistique (W)	0,921	0,924	0,927	0,913	0,920
	Valeur de p	0,020	0,024	0,029	0,011	0,018

Pour les données non transformées, l'allure des histogrammes et le test de Shapiro-Wilk indiquent que pour toutes les transitions ainsi que pour la somme des transitions, les données ne sont pas distribuées normalement. Les distributions sont asymétriques vers la gauche. La

transformation vers la racine carrée des valeurs approche les distributions de la normalité, mais celles-ci demeurent tout de même anormales en se fiant au test de Shapiro-Wilk ($W : 0,913-0,927$, $p = 0,011-0,029$). La transformation sur une échelle logarithmique approche davantage les données de la normalité, la base n'ayant aucune importance. L'allure des distributions et le test statistique de Shapiro-Wilk sont identiques pour les deux bases logarithmiques ($W : 0,960-0,977$ $p = 0,265-0,691$). C'est avec les données transformées sur une échelle logarithmique de base 10 que les analyses ont ensuite été conduites.

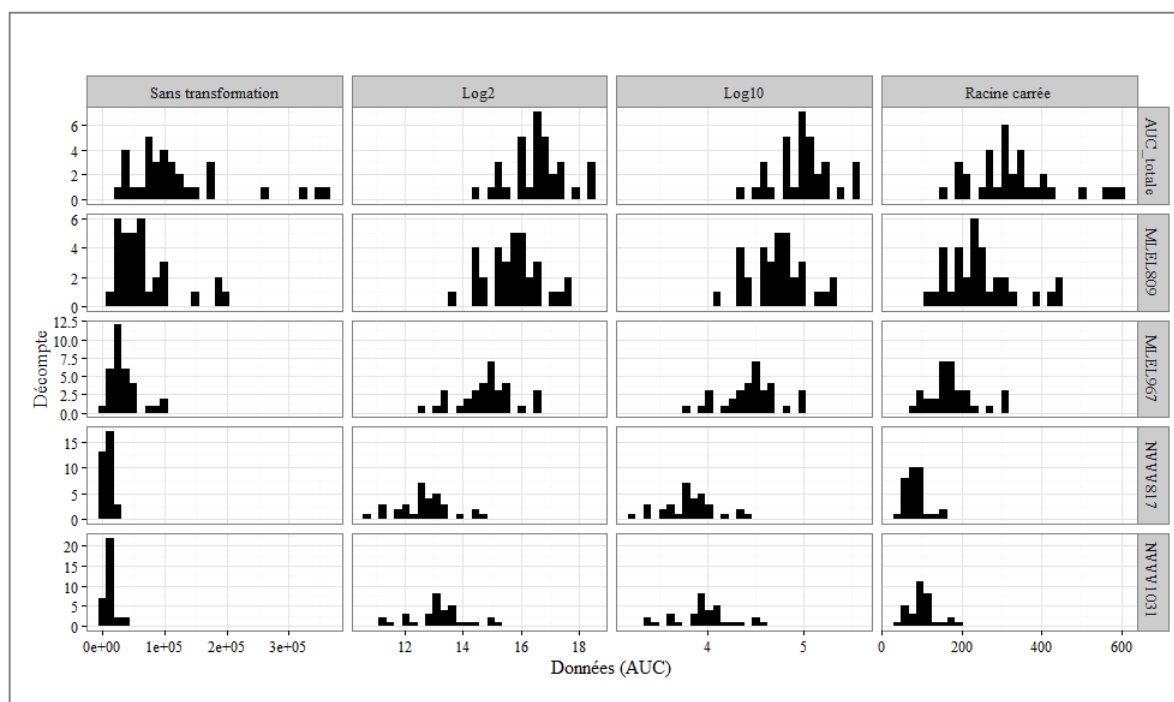


Figure 25. Distribution des données

Les histogrammes décrivent les distributions de données brutes et transformées sous une échelle logarithmique de bases 2 et 10 ainsi que les données transformées par la racine carrée des AUC totales. Les graphiques sont répartis en matrice en fonction de la transformation effectuée (colonnes) et en fonction de la transition (rangées).

4.3.2 Somme de l'aire sous la courbe pour comparer les échantillons

Puisque la digestion trypsique est faite directement sur les billes, il est possible de supposer que l'accessibilité de la trypsine aux différents domaines de la protéine soit variable, affectant par le fait même la proportionnalité entre les différentes transitions et les dosages. En ce sens, si les courbes standards sont utilisées pour estimer la concentration moyenne de PACE4-

CtCons dans le plasma, celle-ci diffère en fonction du peptide utilisé pour l'estimation ($1,8 \pm 1,3$ nM avec le peptide MLELSAPELEPPK et $6,6 \pm 4,5$ nM avec le peptide NVVVITLDDGIER, Test de T avec correction de Welch supposant des variances non équivalentes : $p < 0,0001$). Ainsi, la somme de l'AUC des 4 transitions utilisées pour PACE4 pourrait être une valeur plus juste pour comparer les niveaux de PACE4 dans les échantillons comparativement à faire une estimation avec chaque transition individuellement. Pour valider que les transitions varient de façon équivalente et que l'AUC totale corrèle bien avec toutes les transitions, une matrice de corrélation a été générée avec les données brutes et transformées.

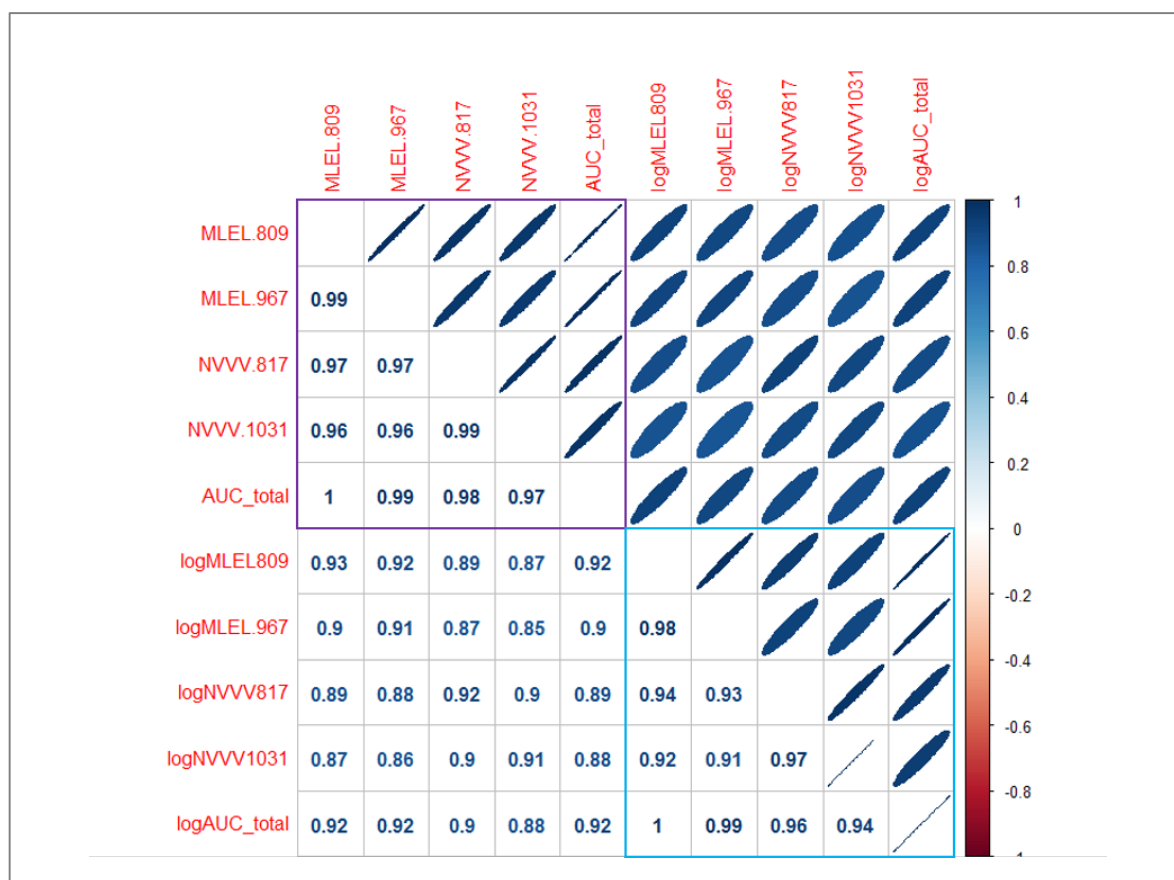


Figure 26. Corrélation entre l'AUC totale et l'AUC des transitions individuelles

Une matrice de corrélation a été générée entre les différentes transitions de PACE4 et la somme de toutes les transitions (AUC totale). Une représentation graphique du coefficient de corrélation est illustrée dans la demie supérieure de la matrice de corrélation. La couleur et l'allure de l'ellipse indiquent le sens et la force du coefficient, une ligne bleu marin indiquant une corrélation fortement positive et une ligne rouge vin étant fortement négative. Les coefficients de corrélation sont affichés dans la partie inférieure de la matrice. Dans le

cadran violet, les coefficients sont ceux comparant les données brutes et dans le cadran cyan, les coefficients sont ceux comparant les données transformées sur une échelle logarithmique de puissance 10. Un X dans la case indique que la corrélation n'est pas statistiquement significative ($p < 0,05$).

Les transitions corrélaient fortement ensemble, le coefficient de corrélation le plus faible étant de 0,96. Il est possible de voir que les deux transitions du peptide MLELSAPELEPPK et celles du peptide NVVVTILDDGIER corrélaient respectivement ensemble de façon parfaite ($r^2=0,99$). Les corrélations demeurent presque parfaites en comparant les peptides entre eux. Les coefficients de corrélation varient entre 0,96 et 0,97. En comparant la somme de l'AUC des transitions avec chacune d'elle individuellement, cette variable corrélaient fortement avec toutes les transitions de PACE4 ($r^2 = 0,97-1,00$), et ce même après la transformation en échelle logarithmique ($r^2 = 0,94-1,00$). Alors, pour comparer les niveaux de PACE4 dans les échantillons, la somme de l'AUC des transitions a été utilisée.

4.3.3 Comparaison des niveaux de PACE4-CtCons dans les échantillons

Tout d'abord, les niveaux de PACE4-CtCons ont été comparés entre les patients sains et les patients atteints d'un CaP (Figure 27A). Il est possible d'observer que les niveaux moyens de PACE4-CtCons dans le sang sont 2,2 x plus élevés chez les patients atteints d'un CaP que chez les patients sains ($p = 0,003$). Ainsi, des niveaux plus élevés de PACE4-CtCons dans le sang pourraient indiquer la présence d'une tumeur à la prostate. Il était par la suite intéressant de vérifier si les niveaux de PACE4 dans le sang augmentent en fonction du stade pathologique et du score de Gleason de la même façon que l'expression tissulaire au niveau des tumeurs. Si les patients sont regroupés en fonction du score de Gleason pathologique (Figure 27B), les données sont distribuées en forme de parabole, augmentant du groupe sain jusqu'au groupe Gleason 7 et diminuant légèrement chez les patients du groupe Gleason 8. Une différence statistiquement significative peut être décelée entre les patients contrôles et les patients ayant un score de Gleason de 7 (ANOVA : $r^2 = 0,304$, $p = 0,014$; Comparaisons multiples avec correction de Turkey : $p < 0,05$). Selon les résultats de l'ANOVA, le score de Gleason expliquerait tout de même 30,4 % de la variance. Par contre, le groupe contrôle influence grandement cette statistique puisqu'aucune corrélation ne peut être établie entre le score de Gleason et les niveaux de PACE4-CtCons sans le groupe contrôle (corrélation de Spearman : $S = 3139,6$, $p = 0,3195$). Les données ont par la suite été groupées en fonction du

stade pathologique (Figure 27C). Étant donné que la majorité des patients inclus dans l'analyse ont une tumeur confinée à la prostate (N=15), les patients ont été placés en deux groupes : les patients dont la tumeur est confinée à la prostate (pT2) et les patients dont la tumeur a des extensions extraprostatiques (>pT2). La comparaison des deux groupes par un test de T de Student suggère qu'il n'y a pas de différence significative entre ces groupes (5 087 versus 5 046, $p=0,747$). Ainsi, les niveaux de PACE4-CtCons dans le sang ne semblent pas apporter d'information sur le stade ou l'agressivité des tumeurs du CaP. Les niveaux de l'APS dans le sang de ces patients ont par la suite été comparés aux niveaux de PACE4-CtCons pour voir si une relation existe entre les deux marqueurs (Figure 27D). L'analyse de régression linéaire entre les AUC totales de PACE4-CtCons et les niveaux d'APS sérique indique qu'il n'y a pas de relation significative entre ces deux variables (corrélation de Pearson, $r^2= 0,024$, $p=0,390$). Les deux marqueurs semblent varier indépendamment l'un de l'autre et pourraient potentiellement être utilisés de façon complémentaire pour le dépistage du CaP.

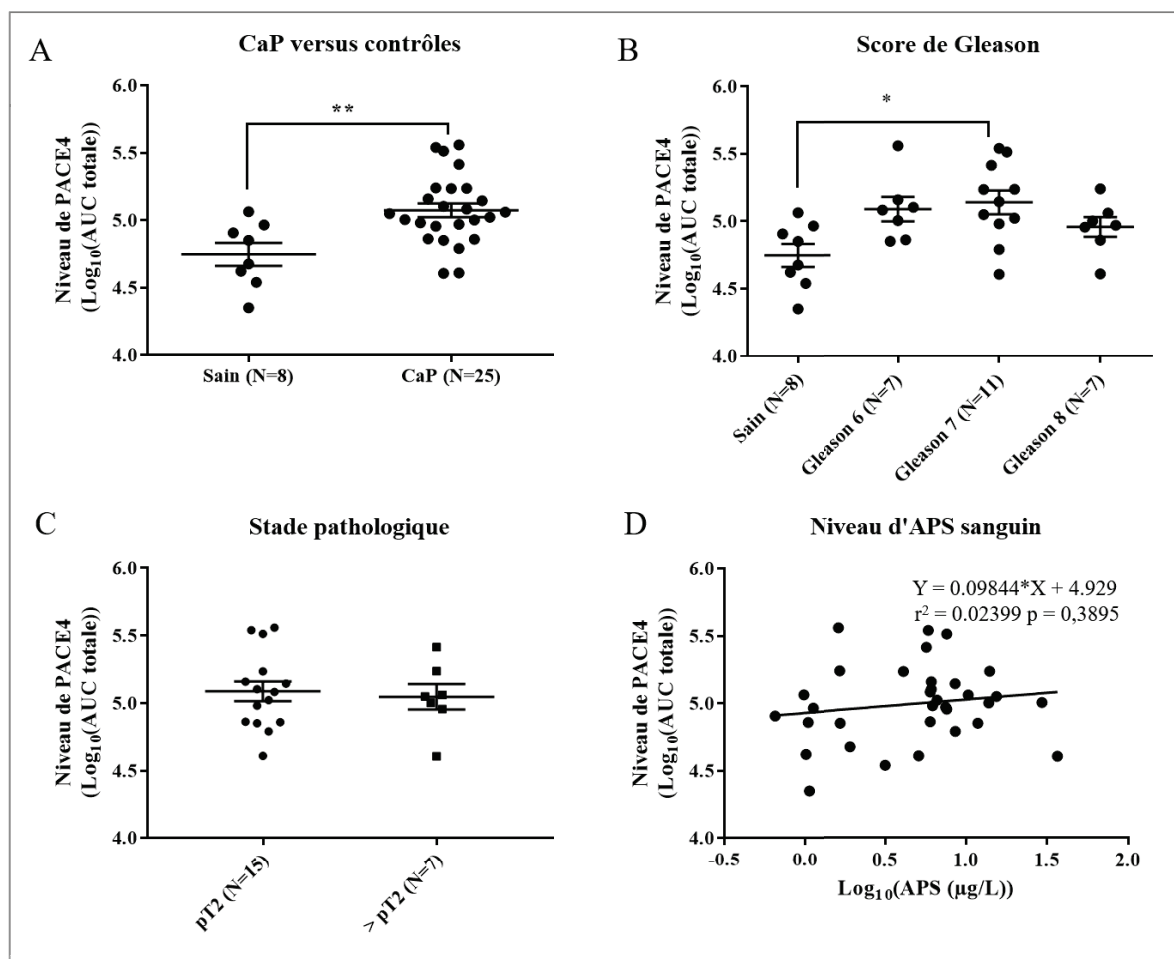


Figure 27. PACE4 est un biomarqueur du CaP indépendant de l'APS

A) Les données transformées de l'AUC totale de PACE4 sont comparées en fonction de l'atteinte ou non d'un CaP (test de T de Student : $p=0,003$), **B)** du score de Gleason pathologique attribué au foyer le plus agressif sur la prostate entière (ANOVA : $p=0,014$, $r^2=0,304$; Comparaisons multiples avec correction de Turkey : * = $p<0,05$) et **C)** du stade pathologique (test de T de Student : $p=0,747$.) Les données sont présentées en nuages de points avec la moyenne (ligne majeure) et l'erreur type de la moyenne (moustaches). **D)** Des tests de corrélation entre l'APS sanguin et les niveaux de PACE4 ont également été faits (corrélation de Pearson, $r^2=0,024$, $p=0,390$).

DISCUSSION

Le CaP est le cancer affectant le plus d'hommes au Canada et la cinquième cause de mortalité par cancer (Comité consultatif de la Société canadienne du cancer, 2015). Le manque d'outil pronostique pour le CaP est un problème clinique auquel il est impératif de s'attaquer. Plusieurs hommes sont traités inutilement pour des tumeurs indolentes et asymptomatiques tandis que pour une part, le CaP devient résistant à la castration, se soldant par un très mauvais pronostic. Plusieurs études démontrent le rôle crucial de PACE4 pour la tumorigénèse et la progression tumorale. Les études précédentes de notre groupe de recherche ont montré non seulement la surexpression unique de PACE4 au sein de la famille des PCs (Couture *et al.*, 2012; D'Anjou *et al.*, 2011), mais aussi une association entre les niveaux de PACE4 dans les tissus et le stade pathologique (D'Anjou *et al.*, 2011), ainsi que le score de Gleason. Ainsi, l'hypothèse que PACE4 pourrait être un biomarqueur utile dans le CaP est tout à fait logique. Notre recherche a également mis en évidence PACE4-CtAlt, une isoforme de l'épissage alternatif de PACE4 toujours inconnu dans la littérature. Il était ainsi intéressant de vérifier le potentiel de ce candidat comme biomarqueur du CaP.

5.1 Méthode pseudoMRM

Dans ce mémoire, la majorité du travail accompli fut de mettre au point un essai basé sur la spectrométrie de masse permettant de doser les niveaux de PACE4-CtCons et PACE4-CtAlt dans le sang ou l'urine. L'utilisation de la MS s'est grandement améliorée au cours des dernières années avec l'adaptation de méthodes d'analyse comme le MRM en protéomique quantitative (Picotti et Aebersold, 2012). De nos jours, cette technologie est couramment utilisée pour le dépistage de drogues dans l'organisme et pour l'étude de la pharmacocinétique de composées, mais elle est de plus en plus acceptée en clinique pour le dosage de différents biomarqueurs associés à plusieurs pathologies. Par exemple, le dosage de l'estradiol (E2) ou la testostérone dans le sang pour évaluer les fonctions du système reproducteur sont des analyses de routine faites dans les laboratoires cliniques (Grebe et Singh, 2011). Cette plateforme technologique est idéale pour mettre au point un essai de dosage de PACE4, puisque ce mode d'analyse est à la fois sensible, sélectif et quantitatif. Dans cette étude, 6 transitions (2 par peptides) ont été sélectionnées et optimisées pour trois peptides (MLELSAPELEPPK, NVVVITLDDGIER, LETFWVVTGR) permettant de faire

le suivi spécifique de PACE4-CtCons et PACE4-CtAlt. Les peptides MELESAPELEPPK et NVVVTILDDGIER sont communs aux deux isoformes tandis que le peptide LETFWVTTGR est unique à PACE4-CtAlt. Les courbes standards avec les peptides MELESAPELEPPK et NVVVTILDDGIER qui ont été générées ont permis de conclure que l'essai est sensible et permet de doser 2,7 nM de PACE4. Par contre, puisque les courbes ont été faites dans l'eau, on peut s'attendre à une limite de détection plus élevée dans un échantillon complexe comme le plasma. Les courbes non linéaires obtenues par la dilution en série du peptide MELESAPELEPPK indiquent que la source ou le détecteur est saturé à de fortes concentrations de ce peptide ce qui affecte légèrement la plage dynamique de ce peptide. Avec le peptide NVVVTILDDGIER, elles sont linéaires pour les deux transitions sur toute l'étendue de concentrations qui a été testée. Parmi les transitions mises au point, c'est la transition 727,4/809,4 qui est la plus sensible et elle influence grandement les résultats. En effet, sur la matrice de corrélation qui a été générée avec les dosages dans le plasma des patients atteints d'un CaP, cette transition corrèle plus fortement avec les AUC totales comparativement aux autres transitions. La méthode pseudoMRM est somme toute sensible et les limites de détection sont comparables à celles que l'on peut retrouver avec des méthodes MRM faites sur des peptides (0,05 nM à 4,5 nM) en protéomique quantitative. (Mani *et al.*, 2012).

Pour valider le choix des peptides sélectionnés, une recherche de PACE4 a été faite sur la base de données MRM, PeptideAtlas, pour voir si des études protéomiques avaient observé ces peptides. Cette base de données disponible en ligne contient un ensemble d'outils pour la sélection et la mise au point de transitions en MRM dans plusieurs organismes vivants ainsi que plusieurs données brutes et analysées (Desiere *et al.*, 2006). Dans la construction humaine de la base de données en 2016 (*Human 2016*; consulté le 05/08/2016), le peptide NVVVTILDDGIER est le troisième peptide le plus observé (33 x) de PACE4. Il a été observé dans 11 échantillons uniques. Malgré qu'entre nos mains, le peptide MELESAPELEPPK soit le plus sensible, il n'a été observé qu'une fois dans 1 échantillon sur cette base de données. Le peptide C-terminal n'a jamais été observé ce qui n'est pas surprenant si le segment C-terminal n'est pas inclus dans les bases de données comme Uniprot utilisées pour l'alignement des spectres et l'identification des protéines.

L'analyse MRM permet de multiplexer les analyses et de faire le suivi de plusieurs biomarqueurs en parallèle. Des transitions pour un peptide de l'APS, LSEPAELTDAVK, ont d'ailleurs été mises au point afin d'intégrer ce biomarqueur à l'essai par l'ajout d'un anticorps monoclonal biotinylé dans l'IP-pseudoMRM pour doser spécifiquement l'APS. Ce peptide a couramment été utilisé dans les études pour faire le suivi de l'APS en MRM (Keshishian *et al.*, 2007; Klee *et al.*, 2014; Kulasingam *et al.*, 2008; Végvári *et al.*, 2013). Il serait alors possible de faire une preuve de concept de la méthode d'IP-pseudoMRM en comparant les dosages à ceux faits en cliniques.

5.2 Déplétion des protéines abondantes

Pour détecter PACE4 dans des échantillons sanguins, la complexité du protéome rend la tâche plus difficile. La décomplexification des échantillons est donc essentielle. Dans cette étude, deux grandes stratégies ont été explorées : la déplétion des protéines abondantes et l'IP-pseudoMRM. Premièrement, l'emploi d'une colonne MARS14 sur 200 μ L de plasma n'a pas permis de détecter les isoformes de PACE4 puisqu'elles se retrouvent probablement à des concentrations inférieures à la limite de détection de l'essai. Ce type de colonne est couramment utilisé dans les études protéomiques, puisque celles-ci sont très efficaces à retirer les protéines très abondantes et elles sont idéales pour l'étude des protéines de moyenne abondance. Par contre, selon une étude, son emploi pour l'étude des protéines de très faible abondance comme PACE4 pourrait être limité. L'étude conclut que ce type de colonne ne confère aucun avantage significatif à détecter un nombre plus élevé de protéines de très faible abondance en protéomique comparativement à l'étude du plasma total (Tu *et al.*, 2010). Une combinaison de la colonne MARS14 avec l'IP-pseudoMRM pourrait cependant être une avenue intéressante à explorer pour augmenter la sensibilité de l'essai. Aussi, en considérant qu'une méthode MRM détecte une quantité de peptide et non une concentration, le volume n'était peut-être pas assez grand pour permettre d'observer un signal correspondant aux peptides de PACE4. Par contre, l'utilisation d'un plus grand volume n'est pas souhaitable avec la colonne centrifuge qui a été utilisée, puisque ça compliquerait grandement l'expérimentation considérant que toutes les étapes sont faites manuellement. Des colonnes MARS14 pour HPLC avec une capacité plus élevée (200 μ L de plasma par passage) sont aussi disponibles et pourraient simplifier l'expérimentation par

l'automatisation de la méthode. En somme, pour détecter PACE4 dans le sang, l'emploi seul de la colonne MARS14 n'est pas suffisant.

5.3 Mise au point de l'essai IP-pseudoMRM

Un essai combinant une IP et l'analyse pseudoMRM a également été mis au point pour ces travaux. Pour ce faire, trois anticorps spécifiques ont été produits, l'anti-domaine P, l'anti-CtCons et l'anti-CtAlt. Avec ces anticorps, des courbes standards ont été générées pour s'assurer que l'essai puisse doser PACE4-CtCons et PACE4-CtAlt de façon concentration dépendante. Rapidement, les courbes atteignent les limites de détection de l'essai. Il est cependant impossible de cibler l'étape déterminante de la sensibilité de l'essai : la méthode pseudoMRM ou la sensibilité des anticorps. En effet, si les courbes standards faites avec les peptides synthétiques étaient utilisées pour estimer une limite de détection de l'essai, il est possible de supposer que la limite de détection serait essentiellement celle de la méthode pseudoMRM, puisque le volume de lysat n'indique pas la quantité absolue de PACE4 qui a été ajoutée au plasma de souris. De cette façon, les paramètres calculés ne seraient pas représentatifs. Pour connaître les limites de détection et de quantification de l'essai, il faudrait absolument que la PACE4 soit pure, ce que nous n'avons pas sous les mains. L'emploi des lysats cellulaires demeure ainsi la meilleure option disponible pour, au moins, montrer une relation dose-réponse, ce qui a été fait. Avec l'anti-domaine P, un signal contaminant sur le peptide NVVVTILDDGIER a été décelé dans l'expérience de validation. Ce signal provient vraisemblablement du plasma de souris. Le peptide NVVVTILDDGIER est commun dans l'espèce murine, ce qui n'est pas le cas du peptide MLELSAPELEPPK. Si PACE4 est sécrétée dans le plasma humain, on peut s'attendre à retrouver PACE4 dans le plasma murin également.

À l'aide de l'essai d'IP-pseudoMRM, PACE4-CtCons a été détecté dans le plasma humain sans interférence avec une intensité distincte du bruit de fond et avec un bon niveau de confiance (2 transitions pour 2 peptides). Par contre, pour ce faire, un volume de 1 mL est nécessaire, ce qui entraîne un biais de sélection puisque des volumes limités d'échantillons sont disponibles pour plusieurs plasmas dans la biobanque. Cette limite a justifié en partie le choix de la stratégie pour discriminer PACE4-CtCons et PACE4-CtAlt puisque l'emploi d'un seul anticorps réduit le volume nécessaire à 1 mL à défaut d'un minimum de 2 mL si deux

anticorps sont utilisés, ce qui augmente le nombre d'échantillons disponibles. Au contraire, dans tous les échantillons cliniques analysés d'urine ou de plasma humains, jamais PACE4-CtAlt n'a été détectée avec un bon niveau de confiance. Une méthode plus sensible pourrait possiblement permettre de la détecter, mais en étudiant la forme alternative, il a été établi par immunobuvardage de type Western sur le milieu de culture de cellules surexprimant les isoformes, que PACE4-CtAlt est moins sécrétée que la forme consensuelle (Couture *et al.*, manuscrit en préparation). Ainsi, il est possible de croire que si PACE4-CtAlt se retrouve dans le plasma, c'est à des concentrations trop faibles pour être détectée par l'essai IP-pseudoMRM. Aussi, la dégradation des extrémités par les exopeptidases présentes dans le plasma est une hypothèse qui ne peut être écartée. Elle expliquerait aussi la différence qui a été observée entre les niveaux détectés par l'IP-pseudoMRM avec l'anti-domaine P et les niveaux plus faibles observés par l'IP-pseudoMRM avec l'anti-CtCons. En plus, l'anti-domaine P semble moins bien reconnaître la forme alternative. L'ensemble de ces observations pourrait expliquer l'incapacité d'observer la PACE4-CtAlt dans les prélèvements sanguins.

L'IP-pseudoMRM a également été conduite dans des échantillons d'urine humaine de patients atteints d'un CaP. La détection d'une bande autour de 90 kDa par immunobuvardage western est un résultat qui a tout d'abord été surprenant. Sur la base de ces résultats, l'hypothèse que PACE4 soit présente dans l'urine semblait plausible. Par contre, l'incapacité de détecter PACE4 par IP-pseudoMRM suggère une tout autre conclusion. Aucune base de données ou étude faite dans l'urine n'ont décelé la présence de PACE4. De plus, les essais entrepris pour contrevérifier cette contradiction, l'excision de la bande du gel et le fractionnement Sage ELF, n'ont également pas permis de détecter PACE4 dans l'urine. Ainsi l'ensemble des évidences suggère que la bande à 90 kDa serait attribuable à un artéfact.

5.4 Étude comparative

Une étude comparative sur trente-trois échantillons provenant de patients sains et de patients atteints d'un CaP a été conduite avec l'anti-domaine P par IP-pseudoMRM. Il a été montré que les niveaux relatifs de PACE4-CtCons sont 2,2 x plus élevés dans le sang des patients atteints d'un CaP comparativement aux patients sains. Ainsi, l'hypothèse que la surexpression de PACE4-CtCons dans les tumeurs de la prostate se traduit par une plus

grande libération de celle-ci dans le sang des patients semble plausible. Un niveau basal dans les plasmas est tout de même détectable et peut provenir des autres organes où la PACE4 est exprimée comme dans le foie. Une seule autre étude a dosé les niveaux de PACE4 dans le sang, celle d'Eric W. Klee et ses collaborateurs qui ont vérifié les niveaux de 35 biomarqueurs potentiels du CaP, dont PACE4, dans les sérums de patients atteints d'un CaP de stade avancé (Klee *et al.*, 2012). Ils ont conclu que les niveaux de PACE4 sont généralement plus élevés chez les patients atteints d'un CaP de stade avancé comparativement aux patients sains, ce qui appuie les observations qui ont été faites dans notre étude. Étant donné que plusieurs tissus expriment PACE4-CtCons dans l'organisme, il est possible de supposer PACE4-CtCons serait utile comme biomarqueur complémentaire à l'APS. D'ailleurs, les tests de corrélation qui ont été faits entre les niveaux sanguins de l'APS et ceux de PACE4-CtCons appuient cette hypothèse. L'analyse montre que ces protéines semblent varier de façon indépendante dans le sang et qu'ils pourraient potentiellement être utilisés en combinaison puisque le dosage de ces deux protéines semble donner différentes informations en lien avec la prostate. La prédiction du stade pathologique ou du score de Gleason par le dosage de PACE4-CtCons dans le plasma a également été étudiée, mais aucune relation n'a été établie entre ceux-ci et le niveau de PACE4 dans le plasma.

5.4.1 Forces et faiblesses de l'étude

L'une des forces de notre étude est la puissance statistique suffisante pour supporter les tests statistiques qui ont été faits. Une puissance de 0,88 pour des tailles d'échantillon non équivalente a été calculée avec les données transformées et avec l'aide des progiciels *lsr* et *pwr* dans R. Une autre force de notre étude est la grande variété d'échantillons qui ont été inclus dans l'analyse. La biobanque du laboratoire donne accès à des patients sains et atteints d'un CaP, à différents stades de la maladie et à différents degrés de sévérité, ce qui permet de mieux cerner les relations existantes entre la PACE4 et le développement de la maladie.

Par contre, des améliorations et des biais peuvent également être identifiés dans notre méthode expérimentale. Tout d'abord, un biais expérimental à notre étude peut être associé au type d'échantillons cliniques dans lesquels PACE4 a été dosé. Dans ce sens, les patients sains sont analysés dans le sérum tandis les patients atteints d'un CaP sont analysés dans du plasma. Pour la collecte du plasma, les tubes de collection sont traités avec un anticoagulant

prévenant l'agrégation plaquettaire. Des niveaux non négligeables de PACE4 sont présents dans les plaquettes (Burkhart *et al.*, 2012). Alors, si les plaquettes subissent une lyse cellulaire au cours du transport ou si des plaquettes résiduelles sont congelées au moment de l'entreposage, il pourrait y avoir une surestimation de PACE4 dans ces échantillons. Il est impossible d'ignorer la possibilité que la différence de 2,2 x soit simplement due à la comparaison entre du sérum et du plasma. D'un autre côté, l'activation et l'agrégation plaquettaire résultent en une sécrétion majeure dans le plasma de protéines provenant des plaquettes (Heijnen *et al.*, 1999). On ne peut donc pas exclure l'hypothèse que de la PACE4 soit sécrétée par l'activation des plaquettes, ce qui surestimerait les dosages. Pour éliminer ce biais, une centrifugation additionnelle plus rapide pour éliminer les plaquettes pourrait être faite avant l'entreposage des plasmas à -80°C.

Ensuite, la purification de la PACE4 lourde est primordiale pour l'essai afin d'ajouter un élément normalisateur dans l'analyse. Pour le type d'essai mis au point (l'IP-pseudoMRM), l'emploi de la protéine lourde entière est plus enviable pour normaliser toutes les sources de variabilité. La protéine lourde normaliserait autant l'analyse pseudoMRM que l'IP et permettrait une quantification absolue de PACE4. Plusieurs étapes de l'IP sont des sources de variabilité : il peut y avoir des pertes de billes durant les nombreux lavages ; le couplage biotine-streptavidine entre les anticorps et les billes peut être plus ou moins efficace ; l'interaction anticorps-antigène peut différer entre les échantillons ; et la digestion faite directement sur les billes peut jouer sur l'accessibilité aux différents domaines structuraux par la trypsine pour la digestion. La purification des isoformes lourdes, qui a été faite en une seule étape sur une résine de nickel, n'est pas adéquate pour obtenir un bon rendement de PACE4 pure. Plusieurs protéines semblent lier non spécifiquement la résine et élue au même pH que la PACE4. Une infime quantité d'imidazole pourrait être ajoutée dans les tampons de lavages afin de compétitionner les interactions non spécifiques. Aussi, davantage d'étapes de purification non sélectives comme un tamis moléculaire avant la purification d'affinité pourraient augmenter la pureté de la fraction finale. Il a également été observé qu'une part de PACE4 légère peut être détectée dans les fractions purifiées indiquant que le marquage n'est pas efficace à 100 %. Il faut être certain de réduire au maximum la présence dans les fractions pures de la PACE4 légère pour ne pas surestimer les dosages. Un conditionnement

plus long des cellules dans le milieu SILAC (au moins 2 passages) avant la transfection pourrait être fait pour que toutes les arginines et les lysines utilisées par la cellule soient puisées seulement dans le réservoir ajouté de façon exogène et que les réserves d'arginine et de lysine légères résiduelles dans la cellule soit éliminées. Dans ce sens, un grand effort doit être fait pour purifier une PACE4 isotopiquement marquée. À l'aide de la PACE4 lourde pure, quelques paramètres pourront être vérifiés pour démontrer la robustesse et les performances de l'essai, tels que les limites absolues de détection et de quantification ainsi que la reproductibilité intrajour et interjours.

Dans l'étude de Klee, les analyses sont normalisées simplement par l'ajout des peptides isotopiquement marqués qui sont plus facilement purifiés (Klee *et al.*, 2012). C'est une autre force de cette étude. Ils ont employé une méthode qui s'appelle le SISCAPA (Anderson *et al.*, 2009) et qui consiste à digérer le protéome sérique à la trypsine pour ensuite capturer le peptide d'intérêt en MRM avec un anti-peptide. La méthode demande cependant que le peptide soit à la fois sensible et immunogène afin d'y diriger un anticorps pour faire la capture, ce qui est en quelque sorte une faiblesse de leur étude étant donné que cela impose une limite quant au choix des peptides suivis en MRM. Le groupe de Klee fait le suivi d'un seul peptide AEGQWTLEIQDLPSQVR qui est en fait l'un des peptides ayant été identifiés dans l'analyse initiale pour sélectionner les peptides de l'essai pseudoMRM. Ce peptide n'est pourtant pas le plus sensible pour le suivi de PACE4. Il a été abandonné au cours de notre étude.

5.5 Importance de mettre au point un essai de dosage pour PACE4

Malgré que l'importance fonctionnelle de PACE4 soit démontrée dans le cancer en général, peu d'études ont évalué en profondeur son potentiel comme biomarqueur néoplasique. Outre les études faites sur le CaP, 5 études ont été répertoriées dans la littérature. La première étude a analysé 172 cas de cancer du poumon non à petites cellules et ils ont montré, par PCR quantitative et par IHC, que l'expression de PACE4 est associée au stade pathologique, à la présence de métastases aux nœuds lymphatiques et à un mauvais pronostic. Les cas dont l'expression de PACE4 est nulle ou faible avaient un taux de survie et un temps sans présence de la maladie plus grands que les cas dont l'expression était élevée (Lin *et al.*, 2015). Un second groupe de recherche a choisi trois gènes, *GLUT3*, *HSAL2* et *PCSK6* (encodant pour

PACE4), d'une liste de 77 gènes étant surexprimés dans les tissus de cancer épidermoïde de la langue comparativement aux tissus sains adjacents, et ils les ont comparés par PCR quantitative dans une cohorte de 49 patients pour voir si l'expression de ces gènes était associée au pronostic de ce type de cancer. Dans cette étude, *PCSK6* ne corrélait avec aucun paramètre pronostique du cancer épidermoïde de la langue (Estilo *et al.*, 2009). Une troisième étude a mis en évidence par PCR qu'une expression faible de *PCSK6* au niveau des tumeurs était positivement associée à un taux de survie plus élevé chez des patients atteints d'un cholangiocarcinome intrahépatique (Wang *et al.*, 2016). Les auteurs de la quatrième étude qui a été répertoriée ont fait une micropuce d'analyse de l'expression de plusieurs gènes dans le but d'identifier des gènes associés à l'invasion des glioblastomes et ils ont validés 27 gènes surexprimés dont l'ontologie génique était associée à l'invasion dont en autre *PCSK6*. L'IHC fait sur des tissus a montré que le marquage de PACE4 était consistant autant dans les zones riches en cellules et les zones infiltrantes (Delic *et al.*, 2012). Enfin, une étude a identifié *PCSK6* parmi 117 gènes dont l'expression est différente dans les tissus de carcinome hépatocellulaire et les tissus sains avoisinants (20 paires) à l'aide d'un essai en PCR ciblant 3370 gènes sans toutefois faire des analyses comparatives (Kurokawa *et al.*, 2004).

Dans l'ensemble, aucune étude n'a fait la quantification absolue des niveaux protéiques de PACE4. L'information qui peut être tirée d'une analyse en IHC est assez relative et elle est fortement influencée par l'expérimentateur et par l'évaluateur (Matos *et al.*, 2010). L'essai d'IP-pseudoMRM de PACE4 qui est mis en place permettra d'avoir des données objectives et quantitatives. Cet essai est également simple et pourrait facilement être intégré dans les analyses biochimiques de routine et à l'étude des biomarqueurs potentiels dans différentes pathologies, autres que le CaP, pour vérifier si les niveaux de PACE4-CtCons ou PACE4-CtAlt sont associés au risque de développer ces maladies. Il est ainsi primordial d'avoir un essai permettant de doser les niveaux protéiques absolus de PACE4-CtCons et PACE4-CtAlt.

CONCLUSIONS

En conclusion, les travaux de ce mémoire font état du grand défi que représente la démonstration du potentiel d'un nouveau biomarqueur en clinique. Plusieurs étapes sont cruciales pour arriver à ces fins. Tout d'abord, il faut une méthode facile, sensible et robuste qui permet de doser de façon dose-dépendante les biomarqueurs en questions. Pour PACE4-CtCons et PACE4-CtAlt, aucun test biochimique ne permettait de doser précisément les protéines. Un essai d'IP-pseudoMRM sensible permettant de discriminer les deux isoformes a ainsi été mis au point. Quelques détails techniques demeurent toutefois à régler pour avoir un essai robuste, comme l'ajout d'un élément normalisateur (la protéine lourde). Ensuite, il faut déterminer dans quels échantillons les analyses seront faites. Pour la clinique, les prélèvements sanguins et urinaires sont plus enviables, mais représentent des défis en soi. Dans ces travaux, il a été montré que l'emploi seul d'une colonne de déplétion des protéines abondantes n'était pas suffisant pour faire la détection de PACE4 dans le plasma humain de patients atteints d'un CaP par pseudoMRM. Seules les IP-pseudoMRM avec l'anti-domaine P et l'anti-CtCons permettait de détecter PACE4 dans le plasma humain suggérant que si la PACE4-CtAlt atteint le sang, c'est à des concentrations trop faibles pour être détecté dans notre essai. Aussi, dans l'urine humaine, il n'y aurait pas de PACE4-CtCons, ni de PACE4-CtAlt. Jamais elles n'ont été décelées dans l'urine et aucune base de données ou étude ne démontrent le contraire. Malgré que la majorité des travaux présentés soient de la mise au point de méthode, les niveaux relatifs de PACE4-CtCons dans le plasma ont tout de même été comparés entre des patients sains et des patients atteints d'un CaP et il a été confirmé que les niveaux sont plus élevés chez ces derniers. Cependant, les niveaux varieraient de façon indépendante à l'APS, du stade pathologique et du score de Gleason. En tout, le travail fait au cours de ma maîtrise établit la base pour obtenir un essai clinique robuste et fiable permettant de faire le dosage absolu de PACE4-CtCons dans le but d'évaluer son potentiel comme biomarqueur sérique du CaP.

6.1 Perspectives

Pour la suite du projet, il est impératif de purifier les isoformes de PACE4 isotopiquement marquées avec une pureté parfaite et un rendement optimal pour normaliser l'essai. Il faudrait aussi augmenter davantage la sensibilité de l'essai dans le but de réduire le volume

d'échantillon utilisé. Une possibilité serait de faire les analyses MRM sur un appareil MS ayant des analyseurs plus spécialisés pour le MRM comme un triple quadripôle (QQQ) (Liebler et Zimmerman, 2013). Contrairement au Q-TOF, ces appareils permettent de non seulement sélectionner l'ion précurseur, mais aussi les ions produits qui seront analysés, réduisant le bruit de fond et augmentant la sensibilité. Une autre option serait de mettre au point un essai ELISA de type sandwich. Pour ce faire, il faut produire davantage d'anticorps dans une autre espèce que le lapin puisque le lapin est la seule espèce ayant servi à produire les anticorps disponibles au laboratoire. Dans ce sens, des anticorps monoclonaux dirigés contre les différents domaines de PACE4 sont en production dans la souris. Si ces anticorps sont plus sensibles que ceux disponibles au laboratoire, ils pourraient être utilisés dans l'essai d'IP-pseudoMRM également. Il serait aussi intéressant de vérifier si des corrélations entre les niveaux de PACE4 dans les tumeurs de la prostate et ceux dans le sang de ces mêmes patients pourraient être faites. Cette analyse permettrait d'appuyer l'hypothèse que les niveaux dans le sang sont représentatifs des niveaux exprimés à la prostate. Aussi, une analyse pour vérifier si les niveaux de PACE4 dans le sang peuvent prédire la récurrence biochimique pourrait être intéressante pour vérifier le pouvoir pronostique de PACE4. Enfin, il serait intéressant de vérifier si la combinaison de l'APS et de PACE4 peut améliorer le dépistage des CaP cliniquement significatifs.

REMERCIEMENTS

La réalisation de ce mémoire a été possible grâce à la générosité de plusieurs collaborateurs à qui j'aimerais témoigner toute ma reconnaissance.

À mon directeur de recherche Robert Day, merci sincèrement de m'avoir accueilli dans ton laboratoire depuis mon tout premier stage au baccalauréat et de m'avoir transmis ta passion, ton savoir et tes conseils au cours des 5 ans que j'ai passés au sein de ton équipe. Je suis certain que toutes les qualités professionnelles que j'ai acquises au cours de mon passage me seront utiles pour le restant de ma carrière.

À mon codirecteur de recherche, Robert Sabbagh, merci pour ton dynamisme, ton soutien et pour toutes les connaissances cliniques en urologie que tu m'as transmises. Merci également à toute l'équipe au bloc opératoire ainsi qu'aux autres chirurgiens travaillant sans relâche pour rendre disponibles les spécimens cliniques cruciaux pour le projet.

À tous les membres du laboratoire, merci pour toutes les discussions que nous avons eues sur le projet et pour le support technique et moral. Merci de rendre la vie de laboratoire stimulante et plaisante. Merci également à Hugo Gagnon, chez PhenoSwitch Biosciences pour tout le support technique et pour les analyses de spectrométrie de masse.

Merci au personnel de la clinique préparatoire à la chirurgie, du département de pathologie et des centres de prélèvements du CHUS ayant participé de près ou de loin au projet. Le projet en cours ne peut être accompli sans votre aide précieuse.

À monoureuse, Claudie, merci de m'encourager dans tous mes projets, de me soutenir moralement quand j'ai la mine basse et de partager mes succès.

Un gros merci va à ma famille pour leurs encouragements et leur support au cours de toutes mes études. Votre confiance en moi m'a permis de persévérer et d'accomplir avec fierté cette étape de la vie.

Merci au Pr Xavier Roucou et au Pr Klaus Klarskov d'avoir accepté de faire la correction de mon mémoire.

Enfin, merci à l'Institut de recherche en Santé du Canada (IRSC), au Fond de recherche en santé du Québec (FRQ-S) ainsi qu'à la fondation Mon Étoile pour les généreuses bourses d'étude.

LISTE DES RÉFÉRENCES

- Albright, F., Stephenson, R. A., Agarwal, N., Teerlink, C. C., Lowrance, W. T., Farnham, J. M. et Albright, L. A. C. (2015) Prostate cancer risk prediction based on complete prostate cancer family history. *The Prostate*, vol. 75, n°4, p. 390-398.
- Anderson, N. L. (2002) The Human Plasma Proteome: History, Character, and Diagnostic Prospects. *Molecular & Cellular Proteomics*, vol. 1, n°11, p. 845-867.
- Anderson, N. L., Jackson, A., Smith, D., Hardie, D., Borchers, C. et Pearson, T. W. (2009) SISCAPA peptide enrichment on magnetic beads using an in-line bead trap device. *Molecular & cellular proteomics : MCP*, vol. 8, n°5, p. 995-1005.
- Andriole, G. L., Crawford, E. D., Grubb, R. L., Buys, S. S., Chia, D., Church, T. R., Fouad, M. N., et al. (2012) Prostate cancer screening in the randomized prostate, lung, colorectal, and ovarian cancer screening trial: Mortality results after 13 years of follow-up. *Journal of the National Cancer Institute*, vol. 104, n°2, p. 125-132.
- Arredouani, M. S., Lu, B., Bhasin, M., Eljanne, M., Yue, W., Mosquera, J.-M., Bubley, G. J., et al. (2009) Identification of the transcription factor single-minded homologue 2 as a potential biomarker and immunotherapy target in prostate cancer. *Clinical cancer research : an official journal of the American Association for Cancer Research*, vol. 15, n°18, p. 5794-802.
- Atkinson A.J., J., Colburn, W. A., DeGruttola, V. G., DeMets, D. L., Downing, G. J., Hoth, D. F., Oates, J. A., et al. (2001) Biomarkers and surrogate endpoints: Preferred definitions and conceptual framework. *Clinical Pharmacology and Therapeutics*, vol. 69, n°3, p. 89-95.
- Barrack, E. R. (1997) TGF beta in prostate cancer: a growth inhibitor that can enhance tumorigenicity. *The Prostate*, vol. 31, n°1, p. 61-70.
- Bassi, D. E., Fu, J., Lopez de Cicco, R. et Klein-Szanto, A. J. P. (2005) Proprotein convertases: « master switches » in the regulation of tumor growth and progression. *Molecular carcinogenesis*, vol. 44, n°3, p. 151-161.
- Bedford, M. T. et Van Helden, P. D. (1987) Hypomethylation of DNA in pathological conditions of the human prostate. *Cancer Research*, vol. 47, n°20, p. 5274-5276.
- Benton, S. C., Seaman, H. E. et Halloran, S. P. (2015) Faecal occult blood testing for

- colorectal cancer screening: the past or the future. *Current gastroenterology reports*, vol. 17, n°2, p. 428.
- Bergeron, F., Leduc, R. et Day, R. (2000) Subtilase-like pro-protein convertases: from molecular specificity to therapeutic applications. *Journal of Molecular Endocrinology*, vol. 24, n°1, p. 1-22.
- Bialecki, E. S. et Di Bisceglie, A. M. (2005) Diagnosis of hepatocellular carcinoma. *HPB : the official journal of the International Hepato Pancreato Biliary Association*, vol. 7, n°1, p. 26-34.
- Bubendorf, L., Schöpfer, A., Wagner, U., Sauter, G., Moch, H., Willi, N., Gasser, T. C., et al. (2000) Metastatic patterns of prostate cancer: An autopsy study of 1,589 patients. *Human Pathology*, vol. 31, n°5, p. 578-583.
- Burkhardt, J. M., Vaudel, M., Gambaryan, S., Radau, S., Walter, U., Martens, L., Geiger, J., et al. (2012) The first comprehensive and quantitative analysis of human platelet protein composition allows the comparative analysis of structural and functional pathways. *Blood*, vol. 120, n°15, p. e73-82.
- Carraro, U., Doria, D., Rizzi, C. et Sandri, M. (1994) A new two-step precipitation method removes free-SDS and thiol reagents from diluted solutions, and then allows recovery and quantitation of proteins. *Biochemical and biophysical research communications*, vol. 200, n°2, p. 916-924.
- Catalona, W. J., Richie, J. P., Ahmann, F. R., Hudson, M. A., Scardino, P. T., Flanigan, R. C., DeKernion, J. B., et al. (1994) Comparison of digital rectal examination and serum prostate specific antigen in the early detection of prostate cancer: results of a multicenter clinical trial of 6,630 men. *The Journal of urology*, vol. 151, n°5, p. 1283-1290.
- Catalona, W. J., Smith, D. S., Ratliff, T. L. et Basler, J. W. (1993) Detection of organ-confined prostate cancer is increased through prostate-specific antigen-based screening. *JAMA : the journal of the American Medical Association*, vol. 270, n°8, p. 948-954.
- Chau, C. H., Rixe, O., McLeod, H. et Figg, W. D. (2008) Validation of analytic methods for biomarkers used in drug development. *Clinical cancer research : an official journal of the American Association for Cancer Research*, vol. 14, n°19, p. 5967-76.
- Chen, R. C., Rumble, R. B., Loblaw, D. A., Finelli, A., Ehdaie, B., Cooperberg, M. R., Morgan, S. C., et al. (2016) Active Surveillance for the Management of Localized

- Prostate Cancer (Cancer Care Ontario Guideline): American Society of Clinical Oncology Clinical Practice Guideline Endorsement. *Journal of Clinical Oncology*, vol. 34, n°18, p. 2182-2190.
- Chen, Z. et Kim, J. (2016) Urinary proteomics and metabolomics studies to monitor bladder health and urological diseases. *BMC Urology*, vol. 16, n°1, p. 11.
- Collège des médecins du Québec (2013) Le dépistage du cancer de la prostate - mise à jour 2013. Lignes directrices du Collège des médecins du Québec. Montréal (Québec) : 33 p.
- Comité consultatif de la Société canadienne du cancer (2015) Statistiques canadiennes sur le cancer 2015. Toronto (Ontario) : 160 p.
- Couture, F., D'Anjou, F. et Day, R. (2011) On the cutting edge of proprotein convertase pharmacology: from molecular concepts to clinical applications. *BioMolecular Concepts*, vol. 2, n°5, p. 421-438.
- Couture, F., D'Anjou, F., Desjardins, R., Boudreau, F. et Day, R. (2012) Role of Proprotein Convertases in Prostate Cancer Progression. *Neoplasia*, vol. 14, n°11, p. 1032-1042.
- Couture, F., Levesque, C., Dumulon-Perreault, V., Ait-Mohand, S., D'Anjou, F., Day, R. et Guérin, B. (2014) PACE4-based molecular targeting of prostate cancer using an engineered ⁶⁴Cu-radiolabeled peptide inhibitor. *Neoplasia*, vol. 16, n°8, p. 634-643.
- Couture, F., Sabbagh, R., Kwiatkowska, A., Desjardins, R., Guay, S.-P., Bouchard, L. et Day, R. (2016) PCSK6 Undergoes an Oncogenic Alternative Splicing Switch in Cancer. *Manuscrit en préparation*.
- Creemers, J. W. M. et Khatib, A.-M. (2008) Knock-out mouse models of proprotein convertases: unique functions or redundancy? *Frontiers in bioscience : a journal and virtual library*, vol. 13, p. 4960-4971.
- Creemers, J. W. M., Siezen, R. J., Roebroek, A. J. M., Ayoubi, T. A. Y., Huylebroeck, D. et Van De Ven, W. J. M. (1993) Modulation of furin-mediated proprotein processing activity by site-directed mutagenesis. *Journal of Biological Chemistry*, vol. 268, n°29, p. 21826-21834.
- D'Anjou, F., Routhier, S., Perreault, J., Latil, A., Bonnel, D. et Fournier, I. (2011) Molecular Validation of PACE4 as a Target in Prostate Cancer. *Oncology*, vol. 4, n°3, p. 157-172.
- Dall'Era, M. A., Albertsen, P. C., Bangma, C., Carroll, P. R., Carter, H. B., Cooperberg, M.

- R., Freedland, S. J., et al. (2012) Active surveillance for prostate cancer: a systematic review of the literature. *European urology*, vol. 62, n°6, p. 976-983.
- Damaschke, N. A., Yang, B., Bhusari, S., Svaren, J. P. et Jarrard, D. F. (2013) Epigenetic Susceptibility Factors for Prostate Cancer With Aging. *Prostate*, vol. 73, n°16, p. 1721-1730.
- Declercq, J., Meulemans, S., Plets, E. et Creemers, J. W. M. (2012) Internalization of proprotein convertase PC7 from plasma membrane is mediated by a novel motif. *The Journal of biological chemistry*, vol. 287, n°12, p. 9052-9060.
- Delic, S., Lottmann, N., Jetschke, K., Reifenberger, G. et Riemenschneider, M. J. (2012) Identification and functional validation of CDH11, PCSK6 and SH3GL3 as novel glioma invasion-associated candidate genes. *Neuropathology and applied neurobiology*, vol. 38, n°2, p. 201-212.
- Demichelis, F. et Stanford, J. L. (2014) Genetic predisposition to prostate cancer: Update and future perspectives. *Urologic oncology*, vol. 33, n°2, p. 1-10.
- Desiere, F., Deutsch, E. W., King, N. L., Nesvizhskii, A. I., Mallick, P., Eng, J., Chen, S., et al. (2006) The PeptideAtlas project. *Nucleic acids research*, vol. 34, n°Database issue, p. D655-658.
- Eder, J., Rheinhecker, M. et Fersht, A. R. (1993) Folding of subtilisin BPN': characterization of a folding intermediate. *Biochemistry*, vol. 32, n°1, p. 18-26.
- Eeles, R. A., Olama, A. A. Al, Benlloch, S., Saunders, E. J., Leongamornlert, D. A., Tymrakiewicz, M., Ghoussaini, M., et al. (2013) Identification of 23 new prostate cancer susceptibility loci using the iCOGS custom genotyping array. *Nature Genetics*, vol. 45, n°4, p. 385-391.
- Esteller, M. (2007) Cancer epigenomics: DNA methylomes and histone-modification maps. *Nature reviews. Genetics*, vol. 8, n°4, p. 286-298.
- Estilo, C. L., O-charoenrat, P., Talbot, S., Socci, N. D., Carlson, D. L., Ghossein, R., Williams, T., et al. (2009) Oral tongue cancer gene expression profiling: Identification of novel potential prognosticators by oligonucleotide microarray analysis. *BMC cancer*, vol. 9, p. 11.
- Fugère, M. et Day, R. (2005) Cutting back on pro-protein convertases: the latest approaches to pharmacological inhibition. *Trends in pharmacological sciences*, vol. 26, n°6, p.

294-301.

- Goodman, L. J. et Gorman, C. M. (1994) Autoproteolytic activation of the mouse prohormone convertase mPC1. *Biochemical and biophysical research communications*, vol. 201, n°2, p. 795-804.
- Goodsaid, F. et Frueh, F. (2007) Biomarker qualification pilot process at the US Food and Drug Administration. *The AAPS journal*, vol. 9, n°1, p. E105-E108.
- Grebe, S. K. et Singh, R. J. (2011) LC-MS/MS in the Clinical Laboratory - Where to From Here? *The Clinical biochemist. Reviews / Australian Association of Clinical Biochemists*, vol. 32, n°1, p. 5-31.
- Gyamera-Acheampong, C. et Mbikay, M. (2009) Proprotein convertase subtilisin/kexin type 4 in mammalian fertility: a review. *Human reproduction update*, vol. 15, n°2, p. 237-47.
- Heijnen, H. F., Schiel, A. E., Fijnheer, R., Geuze, H. J., Sixma, J. J., Holme, P., Solum, N., et al. (1999) Activated platelets release two types of membrane vesicles: microvesicles by surface shedding and exosomes derived from exocytosis of multivesicular bodies and alpha-granules. *Blood*, vol. 94, n°11, p. 3791-3799.
- Helfand, B. T. et Catalona, W. J. (2014) The Epidemiology and Clinical Implications of Genetic Variation in Prostate Cancer. *Urologic Clinics of North America*, vol. 41, n°2, p. 277-297.
- Henrich, S., Lindberg, I., Bode, W. et Than, M. E. (2005) Proprotein convertase models based on the crystal structures of furin and kexin: Explanation of their specificity. *Journal of Molecular Biology*, vol. 345, n°2, p. 211-227.
- Horoszewicz, J. S., Leong, S. S., Kawinski, E., Karr, J. P., Rosenthal, H., Chu, T. M., Mirand, E. A., et al. (1983) LNCaP model of human prostatic carcinoma. *Cancer research*, vol. 43, n°4, p. 1809-1818.
- Jahn, J. L., Giovannucci, E. L. et Stampfer, M. J. (2015) The high prevalence of undiagnosed prostate cancer at autopsy: Implications for epidemiology and treatment of prostate cancer in the Prostate-specific Antigen-era. *International Journal of Cancer*, vol. 137, n°12, p. 2795-2802.
- Kang, S., Zhao, Y., Hu, K., Xu, C., Wang, L., Liu, J., Yao, A., et al. (2014) miR-124 exhibits antiproliferative and antiaggressive effects on prostate cancer cells through PACE4 pathway. *The Prostate*, vol. 74, n°11, p. 1095-1106.

- Keshishian, H., Addona, T., Burgess, M., Kuhn, E. et Carr, S. a (2007) Quantitative, multiplexed assays for low abundance proteins in plasma by targeted mass spectrometry and stable isotope dilution. *Molecular & cellular proteomics : MCP*, vol. 6, n°12, p. 2212-29.
- Kitteringham, N. R., Jenkins, R. E., Lane, C. S., Elliott, V. L. et Park, B. K. (2009) Multiple reaction monitoring for quantitative biomarker analysis in proteomics and metabolomics. *Journal of chromatography. B, Analytical technologies in the biomedical and life sciences*, vol. 877, n°13, p. 1229-39.
- Klee, E. W., Bondar, O. P., Goodmanson, M. K., Dyer, R. B., Erdogan, S., Bergstralh, E. J., Bergen, H. R., et al. (2012) Candidate serum biomarkers for prostate adenocarcinoma identified by mRNA differences in prostate tissue and verified with protein measurements in tissue and blood. *Clinical chemistry*, vol. 58, n°3, p. 599-609.
- Klee, E. W., Bondar, O. P., Goodmanson, M. K., Trushin, S. A., Bergstralh, E. J., Singh, R. J., Anderson, N. L., et al. (2014) Serum concentrations of prostate-specific antigen measured using immune extraction, trypsin digestion, and tandem mass spectrometry quantification of LSEPAELTDAVK peptide. *Archives of pathology & laboratory medicine*, vol. 138, n°10, p. 1381-1386.
- Krahn, M. (2014) Prostate cancer screening: going beyond the clinical evidence. *Canadian Medical Association Journal*, vol. 186, n°16, p. 1201-1201.
- Kulasingam, V., Smith, C. R., Batruch, I., Buckler, A., Jeffery, D. A. et Diamandis, E. P. (2008) « Product ion monitoring »; assay for prostate-specific antigen in serum using a linear ion-trap. *Journal of proteome research*, vol. 7, n°2, p. 640-647.
- Kurokawa, Y., Matoba, R., Nakamori, S., Takemasa, I., Nagano, H., Dono, K., Umeshita, K., et al. (2004) PCR-array gene expression profiling of hepatocellular carcinoma. *Journal of experimental & clinical cancer research : CR*, vol. 23, n°1, p. 135-41.
- Kwiatkowska, A., Couture, F., Levesque, C., Ly, K., Beauchemin, S., Desjardins, R., Neugebauer, W., et al. (2016) Novel Insights into Structure-Activity Relationships of N-Terminally Modified PACE4 Inhibitors. *ChemMedChem*, vol. 11, n°3, p. 289-301.
- Kwiatkowska, A., Couture, F., Levesque, C., Ly, K., Desjardins, R., Beauchemin, S., Prahl, A., et al. (2014a) Design, Synthesis, and Structure–Activity Relationship Studies of a Potent PACE4 Inhibitor. *Journal of Medicinal Chemistry*, vol. 57, n°1, p. 98-109.

- Kwiatkowska, A., Couture, F., Levesque, C., Ly, K., Desjardins, R., Beauchemin, S., Prahl, A., et al. (2014b) Design, synthesis, and structure-activity relationship studies of a potent PACE4 inhibitor. *Journal of Medicinal Chemistry*, vol. 57, n°1, p. 98-109.
- Ladner, C. L., Yang, J., Turner, R. J. et Edwards, R. A. (2004) Visible fluorescent detection of proteins in polyacrylamide gels without staining. *Analytical biochemistry*, vol. 326, n°1, p. 13-20.
- Lamango, N. S., Apletalina, E., Liu, J. et Lindberg, I. (1999) The proteolytic maturation of prohormone convertase 2 (PC2) is a pH-driven process. *Archives of biochemistry and biophysics*, vol. 362, n°2, p. 275-282.
- Lapierre, M., Siegfried, G., Scamuffa, N., Bontemps, Y., Calvo, F., Seidah, N. G. et Khatib, A.-M. (2007) Opposing function of the proprotein convertases furin and PACE4 on breast cancer cells' malignant phenotypes: role of tissue inhibitors of metalloproteinase-1. *Cancer research*, vol. 67, n°19, p. 9030-9034.
- Leduc, R., Molloy, S. S., Thorne, B. a et Thomas, G. (1992) Activation of human furin precursor processing endoprotease occurs by an intramolecular autoproteolytic cleavage. *The Journal of biological chemistry*, vol. 267, n°20, p. 14304-14308.
- Lee, C., Sintich, S. M., Mathews, E. P., Shah, A. H., Kundu, S. D., Perry, K. T., Cho, J. S., et al. (1999) Transforming growth factor-beta in benign and malignant prostate. *The Prostate*, vol. 39, n°4, p. 285-290.
- Levesque, C., Couture, F., Kwiatkowska, A., Desjardins, R., Guérin, B., Neugebauer, W. A. et Day, R. (2015) PACE4 inhibitors and their peptidomimetic analogs block prostate cancer tumor progression through quiescence induction increased apoptosis and impaired neovascularisation. *Oncotarget*, vol. 6, n°6, p. 3680-3693.
- Levesque, C., Fugère, M., Kwiatkowska, A., Couture, F., Desjardins, R., Routhier, S., Moussette, P., et al. (2012) The Multi-Leu Peptide Inhibitor Discriminates Between PACE4 and Furin And Exhibits Antiproliferative Effects On Prostate Cancer Cells. *Journal of Medicinal Chemistry*, vol. 55, n°23, p. 10501-10511.
- Li, L.-C., Okino, S. T. et Dahiya, R. (2004) DNA methylation in prostate cancer. *Biochimica et Biophysica Acta (BBA) - Reviews on Cancer*, vol. 1704, n°2, p. 87-102.
- Liebler, D. C. et Zimmerman, L. J. (2013) Targeted quantitation of proteins by mass spectrometry. *Biochemistry*, vol. 52, n°22, p. 3797-3806.

- Lilja, H. (1985) A kallikrein-like serine protease in prostatic fluid cleaves the predominant seminal vesicle protein. *Journal of Clinical Investigation*, vol. 76, n°5, p. 1899-1903.
- Lilja, H., Oldbring, J., Rannevik, G. et Laurell, C. B. (1987) Seminal vesicle-secreted proteins and their reactions during gelation and liquefaction of human semen. *The Journal of clinical investigation*, vol. 80, n°2, p. 281-285.
- Lilja, H., Ulmert, D. et Vickers, A. J. (2008) Prostate-specific antigen and prostate cancer: prediction, detection and monitoring (Corrigendum). *Nature Reviews Cancer*, vol. 8, n°5, p. 403-403.
- Lin, K., Croswell, J. M., Koenig, H., Lam, C. et Maltz, A. (2011) Prostate-Specific Antigen-Based Screening for Prostate Cancer : An Evidence Update for the U.S. Preventive Services Task Force. Rockville,MD : 56 p.
- Lin, Y.-E., Wu, Q.-N., Lin, X.-D., Li, G.-Q. et Zhang, Y.-J. (2015) Expression of paired basic amino acid-cleaving enzyme 4 (PACE4) correlated with prognosis in non-small cell lung cancer (NSCLC) patients. *Journal of thoracic disease*, vol. 7, n°5, p. 850-60.
- Lipkind, G. M., Zhou, A. et Steiner, D. F. (1998) A model for the structure of the P domains in the subtilisin-like prohormone convertases. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, vol. 95, n°13, p. 7310-7315.
- Locke, J. A. et Black, P. C. (2016) Next generation biomarkers in prostate cancer. *Frontiers in bioscience (Landmark edition)*, vol. 21, p. 328-342.
- Ly, K. (2016) Éluclation et identification des différents interacteurs impliqués dans le mécanisme de régulation du LDLR par la protéine PCSK9. Thèse de doctorat, Université de Sherbrooke, 180 p.
- MacLean, B., Tomazela, D. M., Shulman, N., Chambers, M., Finney, G. L., Frewen, B., Kern, R., et al. (2010) Skyline: an open source document editor for creating and analyzing targeted proteomics experiments. *Bioinformatics*, vol. 26, n°7, p. 966-968.
- Malide, D., Seidah, N. G., Chrétien, M. et Bendayan, M. (1995) Electron microscopic immunocytochemical evidence for the involvement of the convertases PC1 and PC2 in the processing of proinsulin in pancreatic beta-cells. *The journal of histochemistry and cytochemistry : official journal of the Histochemistry Society*, vol. 43, n°1, p. 11-19.
- Mani, D. R., Abbatiello, S. E. et Carr, S. a (2012) Statistical characterization of multiple-reaction monitoring mass spectrometry (MRM-MS) assays for quantitative proteomics.

- BMC Bioinformatics, vol. 13, n°Suppl 16, p. S9.
- Matos, L. L. de, Trufelli, D. C., de Matos, M. G. L. et da Silva Pinhal, M. A. (2010) Immunohistochemistry as an important tool in biomarkers detection and clinical practice. *Biomarker insights*, vol. 5, p. 9-20.
- Matthews, G., Shennan, K. I., Seal, A. J., Taylor, N. A., Colman, A. et Docherty, K. (1994) Autocatalytic maturation of the prohormone convertase PC2. *The Journal of biological chemistry*, vol. 269, n°1, p. 588-592.
- Nour, N., Mayer, G., Mort, J. S., Salvas, A., Mbikay, M., Morrison, C. J., Overall, C. M., et al. (2005) The cysteine-rich domain of the secreted proprotein convertases PC5A and PACE4 functions as a cell surface anchor and interacts with tissue inhibitors of metalloproteinases. *Molecular biology of the cell*, vol. 16, n°11, p. 5215-5226.
- Owens, C. et Irwin, M. (2012) Neuroblastoma: the impact of biology and cooperation leading to personalized treatments. *Critical reviews in clinical laboratory sciences*, vol. 49, n°3, p. 85-115.
- Pepe, M. S., Feng, Z., Janes, H., Bossuyt, P. M. et Potter, J. D. (2008) Pivotal evaluation of the accuracy of a biomarker used for classification or prediction: standards for study design. *Journal of the National Cancer Institute*, vol. 100, n°20, p. 1432-1438.
- Picotti, P. et Aebersold, R. (2012) Selected reaction monitoring–based proteomics: workflows, potential, pitfalls and future directions. *Nature Methods*, vol. 9, n°6, p. 555-566.
- Plaimauer, B., Mohr, G., Wernhart, W., Himmelsbach, M., Dorner, F. et Schlokot, U. (2001) « Shed » furin: mapping of the cleavage determinants and identification of its C-terminus. *The Biochemical journal*, vol. 354, n°3, p. 689-695.
- Poirier, S., Hamouda, H. A., Villeneuve, L., Demers, A. et Mayer, G. (2016) Trafficking Dynamics of PCSK9-Induced LDLR Degradation: Focus on Human PCSK9 Mutations and C-Terminal Domain. *PloS one*, vol. 11, n°6, p. e0157230.
- Prensner, J. R., Rubin, M. a, Wei, J. T. et Chinnaiyan, A. M. (2012) Beyond PSA: the next generation of prostate cancer biomarkers. *Science translational medicine*, vol. 4, n°127, p. 127rv3.
- Pullikotil, P., Benjannet, S., Mayne, J. et Seidah, N. G. (2007) The proprotein convertase SKI-1/S1P: alternate translation and subcellular localization. *The Journal of biological*

- chemistry, vol. 282, n°37, p. 27402-27413.
- Ransohoff, D. F. (2007) How to improve reliability and efficiency of research about molecular markers: roles of phases, guidelines, and study design. *Journal of clinical epidemiology*, vol. 60, n°12, p. 1205-1219.
- Rao, A. R., Motiwala, H. G. et Karim, O. M. A. (2008) The discovery of prostate-specific antigen. *BJU International*, vol. 101, n°1, p. 5-10.
- Resnick, M. J., Koyama, T., Fan, K.-H., Albertsen, P. C., Goodman, M., Hamilton, A. S., Hoffman, R. M., et al. (2013) Long-term functional outcomes after treatment for localized prostate cancer. *The New England journal of medicine*, vol. 368, n°5, p. 436-445.
- Romero-Otero, J., García-Gómez, B., Duarte-Ojeda, J. M., Rodríguez-Antolín, A., Vilaseca, A., Carlsson, S. V et Touijer, K. A. (2016) Active surveillance for prostate cancer. *International journal of urology : official journal of the Japanese Urological Association*, vol. 23, n°3, p. 211-218.
- Rousselet, E., Benjannet, S., Hamelin, J., Canuel, M. et Seidah, N. G. (2011) The proprotein convertase PC7: unique zymogen activation and trafficking pathways. *The Journal of biological chemistry*, vol. 286, n°4, p. 2728-2738.
- Sahu, P., Pinkalwar, N., Dubey, R., Paroha, S., Chatterjee, S. et Chatterjee, T. (2011) Biomarkers: an emerging tool for diagnosis of a disease and drug development. *Asian J. Res.*, vol. 1, n°1, p. 9-16.
- Saveliev, S., Bratz, M., Zubarev, R., Szapacs, M., Budamgunta, H. et Urh, M. (2013) Trypsin/Lys-C protease mix for enhanced protein mass spectrometry analysis. *Nature Methods*, vol. 10, n°11.
- Sawyers, C. L. (2008) The cancer biomarker problem. *Nature*, vol. 452, n°7187, p. 548-552.
- Schroder, F. H., Hugosson, J., Roobol, M. J., Tammela, T. L., Ciatto, S., Nelen, V., Kwiatkowski, M., et al. (2012) Prostate-cancer mortality at 11 years of follow-up. *N Engl J Med*, vol. 366, n°11, p. 981-990.
- Seidah, N. G., Chrétien, M. et Day, R. (1994) The family of subtilisin/kexin like pro-protein and pro-hormone convertases: Divergent or shared functions. *Biochimie*, vol. 76, n°3-4, p. 197-209.
- Seidah, N. G. et Prat, A. (2012) The biology and therapeutic targeting of the proprotein

- convertases. *Nature Reviews Drug Discovery*, vol. 11, n°5, p. 367-383.
- Shevchenko, A., Tomas, H., Havli[sbrevet], J., Olsen, J. V et Mann, M. (2007) In-gel digestion for mass spectrometric characterization of proteins and proteomes. *Nature Protocols*, vol. 1, n°6, p. 2856-2860.
- Shinde, U. et Inouye, M. (1993) Intramolecular chaperones and protein folding. *Trends in Biochemical Sciences*, vol. 18, n°11, p. 442-446.
- Siegel, R. L., Miller, K. D. et Jemal, A. (2016) Cancer statistics, 2016. *CA: A Cancer Journal for Clinicians*, vol. 66, n°1, p. 7-30.
- Stamey, T. A., Yang, N., Hay, A. R., McNeal, J. E., Freiha, F. S. et Redwine, E. (1987) Prostate-specific antigen as a serum marker for adenocarcinoma of the prostate. *The New England journal of medicine*, vol. 317, n°15, p. 909-916.
- Stone, K. R., Mickey, D. D., Wunderli, H., Mickey, G. H. et Paulson, D. F. (1978) Isolation of a human prostate carcinoma cell line (DU 145). *International Journal of Cancer. Journal International Du Cancer*, vol. 21, n°3, p. 274-281.
- Sundar, S., Neal, R. D. et Kehoe, S. (2015) Diagnosis of ovarian cancer. *BMJ*, vol. 351, n°8023, p. h4443.
- Takahashi, S., Kasai, K., Hatsuzawa, K., Kitamura, N., Misumi, Y., Ikehara, Y., Murakami, K., et al. (1993) A mutation of furin causes the lack of precursor-processing activity in human colon carcinoma LoVo cells. *Biochemical and Biophysical Research Communications*.
- Takahashi, S., Nakagawa, T., Kasai, K., Banno, T., Duguay, S. J., Van de Ven, W. J. M., Murakami, K., et al. (1995) A second mutant allele of furin in the processing-incompetent cell line, LoVo. Evidence for involvement of the homo B domain in autocatalytic activation. *Journal of Biological Chemistry*, vol. 270, n°44, p. 26565-26569.
- Thomas, G. (2002) Furin at the cutting edge: From protein traffic to embryogenesis and disease. *Nature Reviews Molecular Cell Biology*, vol. 3, n°10, p. 753-766.
- Tu, C., Rudnick, P. A., Martinez, M. Y., Cheek, K. L., Stein, S. E., Slebos, R. J. C. et Liebler, D. C. (2010) Depletion of abundant plasma proteins and limitations of plasma proteomics. *Journal of proteome research*, vol. 9, n°10, p. 4982-91.
- Uchida, K., Chaudhary, L. R., Sugimura, Y., Adkisson, H. D. et Hruska, K. A. (2003)

- Proprotein convertases regulate activity of prostate epithelial cell differentiation markers and are modulated in human prostate cancer cells. *Journal of Cellular Biochemistry*, vol. 88, n°2, p. 394-399.
- Végvári, A., Sjödin, K., Rezeli, M., Malm, J., Lilja, H., Laurell, T. et Marko-Varga, G. (2013) Identification of a novel proteoform of prostate specific antigen (SNP-L132I) in clinical samples by multiple reaction monitoring. *Molecular & cellular proteomics : MCP*, vol. 12, n°10, p. 2761-2773.
- Wang, J., Xie, H., Ling, Q., Lu, D., Lv, Z., Zhuang, R., Liu, Z., et al. (2016) Coding-noncoding gene expression in intrahepatic cholangiocarcinoma. *Translational research : the journal of laboratory and clinical medicine*, vol. 168, p. 107-121.
- Wikström, P., Damber, J. et Bergh, A. (2001) Role of transforming growth factor-beta1 in prostate cancer. *Microscopy research and technique*, vol. 52, n°4, p. 411-419.
- Witte, M. N., Lindaman, B. D. et Rosinsky, D. E. (2015) Why Prostate Cancer Screening is Necessary. *South Dakota Medecine Special Edition*, p. 88-91.
- Xiang, Y., Molloy, S. S., Thomas, L. et Thomas, G. (2000) The PC6B cytoplasmic domain contains two acidic clusters that direct sorting to distinct trans-Golgi network/endosomal compartments. *Molecular biology of the cell*, vol. 11, n°4, p. 1257-1273.
- Yegnasubramanian, S., Haffner, M. C., Zhang, Y., Gurel, B., Cornish, T. C., Wu, Z., Irizarry, R. A., et al. (2008) DNA hypomethylation arises later in prostate cancer progression than CpG island hypermethylation and contributes to metastatic tumor heterogeneity. *Cancer Research*, vol. 68, n°21, p. 8954-8967.
- Zhou, A., Martin, S., Lipkind, G., LaMendola, J. et Steiner, D. F. (1998) Regulatory roles of the P domain of the subtilisin-like prohormone convertases. *Journal of Biological Chemistry*, vol. 273, n°18, p. 11107-11114.

ANNEXES

9.1 License d'utilisation des figures provenant de publications

Figure 4 : License # 3920920407125 obtenue le 2 août 2016 (Seidah et Prat, 2012)

Figure 5A : License # 3920920921772 obtenue le 2 août 2016 (D'Anjou *et al.*, 2011)

Figure 5B : License # 3920980522113 obtenue le 2 août 2016 (Kang *et al.*, 2014)